

AUSLÖSUNG VON ZELLTOD DURCH PEROXID-INDUZIERTEN OXIDATIVEN STRESS IN KULTIVIERTEN C6-ASTROGLIOMAZELLEN

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Manuela Perle

Kiel 2010

Referent: Prof. Dr. Edmund Maser

Korreferent: Prof. Dr. Wolfgang Blaschek

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Dezember 2010

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 09. Dezember 2010

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Zusammenfassung

Oxidativer Stress, wie er beispielsweise durch die Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies oder durch ein unzureichendes antioxidatives Schutzsystem entsteht, kann eine Reihe von oxidativen Schäden in der Zelle verursachen und in hohen Konzentrationen sogar den Tod der Zelle zur Folge haben. In zahlreichen Arbeiten werden Peroxide als Modellsubstanzen zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies verwendet. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die Art des ausgelösten Zelltods, welcher durch Peroxide hervorgerufen wird, abhängig ist von deren Konzentration und der Expositionsdauer. So ist für H_2O_2 beschrieben, dass dieses Peroxid in niedrigen Konzentrationen Apoptose und in hohen Konzentrationen Nekrose in Zellkulturen auslöst. Ziel dieser Arbeit ist es daher herauszufinden, welcher Zelltod in Abhängigkeit von der Konzentration und Expositionsdauer des eingesetzten Peroxids in Kulturen von C6-Gliomazellen ausgelöst wird und ob sich durch den Einsatz von Peroxiden verschiedener Struktur Unterschiede in der Wirkungsweise ergeben. Darüber hinaus sollte herausgefunden werden, ob natürlich vorkommende Antioxidantien wie Quercetin oder α -Tocopherol den Peroxid-induzierten Zelltod beeinflussen können. Und zu guter Letzt, wie sich der unter physiologischen Bedingungen vorhandene kontinuierliche oxidative Stress auf die Art des induzierten Zelltods auswirkt. Erste Experimente mit Staurosporin zeigten, dass in C6-Zellen apoptotischer Zelltod in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration ausgelöst wurde. Das Ausmaß des apoptotischen Zelltods wurde mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33342 und Propidiumjodid, sowie der Caspase-3-Aktivität quantifiziert. Die untersuchten Peroxide Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Cumolhydroperoxid (CHP) und tertiäres Butylhydroperoxid (tert-BuOOH) lösten in der Hauptsache nekrotischen Zelltod aus. In einem kleinen Teil der Zellpopulation wurde im Vergleich zu Staurosporin zeitverzögert und in niedrigen Konzentrationen nach 24 h Apoptose ausgelöst: jeweils 1 % bei

20 μM CHP bzw. 50 μM tert-BuOOH und 4 % bei 200 μM H_2O_2 . Die zytotoxische Potenz der organischen Peroxide war zudem wesentlich größer als die des Wasserstoffperoxids. Der Anstieg im prozentualen Anteil apoptotischer Zellen war lediglich bei Wasserstoffperoxid statistisch signifikant.

Das Polyphenol Quercetin schützte die C6-Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration (10-50 μM) vor dem nekrotischen Zelltod, welcher durch zytoletale Peroxidkonzentrationen (100 μM CHP und tert-BuOOH, 20 mM H_2O_2) ausgelöst wurde. Quercetin alleine bewirkte in 6 % der Zellen Zelltod durch Apoptose. Die Vorinkubation mit α -Tocopherol (5-50 μM) schützte die C6-Zellen vor den zytotoxischen Wirkungen organischer Peroxide, nicht aber vor denen des Wasserstoffperoxids. Zytotoxische Konzentrationen organischer Peroxide, die normalerweise Nekrose hervorriefen, führten bei Vorinkubation mit α -Tocopherol zu höheren Prozentsätzen apoptotischer Zellen. Kontinuierlicher oxidativer Stress, simuliert durch fortwährende Bildung von H_2O_2 durch Glucoseoxidase, löste in C6-Zellen ausschließlich Nekrose aus. Apoptose, kenntlich durch morphologische Charakteristika der Kerne und Aktivierung der Caspase-3, wurde zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass oxidativer Stress ausgelöst durch Peroxide in C6-Zellen nach Bolusgabe in der Hauptsache und bei kontinuierlichem oxidativen Stress ausschließlich Zelltod durch Nekrose auslöst. Antioxidantien können C6-Zellen vor dem Peroxid-induzierten, nekrotischen Zelltod schützen. α -Tocopherol verhindert jedoch nur den nekrotischen Zelltod, welcher durch organische Peroxide ausgelöst wird, führt aber gleichzeitig zu einer erhöhten Apoptoserate. Mit anderen Worten bewirkt α -Tocopherol in einem Teil der Zellpopulation ein Umschalten von der durch organische Peroxide induzierten Nekrose zur Apoptose.

Abstract

Oxidative stress as a result of an overproduction of reactive oxygen species (ROS) or an impairment of the antioxidant defense system can cause oxidative damage and in higher concentrations even cell death. In numerous studies dealing with oxidative stress in vitro peroxides are used as models to induce reactive oxygen species. There is some evidence that the kind of cell death induced by peroxides depends on their concentration and/or exposure duration. For example, H_2O_2 has been reported to cause apoptosis at low and necrosis at high concentrations in cell cultures. The aim of the present study is, therefore, to investigate, whether peroxide-induced cell death results in necrosis or apoptosis in dependence of concentration and exposure duration and to find out differences in the effects of peroxides with different structure. In addition, it should be investigated whether naturally occurring antioxidants can affect peroxide-induced cell death and finally whether continuously generated oxidative stress results in necrotic or apoptotic cell death in cultures of C6 glioma cells. Initial experiments with the apoptose-inducer Staurosporin showed that this compound triggered time- and concentration-dependently apoptotic cell death in C6 cells. The extent of apoptotic cell death has been quantified by means of fluorescence microscopy and caspase-3-activity.

The peroxides hydrogen peroxide (H_2O_2), cumene hydroperoxide (CHP) and t-butyl hydroperoxide (tert-BuOOH) caused predominantly necrotic cell death. In comparison to Staurosporin a delayed induction of apoptosis was detected after 24 h in a small fraction of the cells and at low concentrations: about 1 % at 20 μM CHP and 50 μM tert-BuOOH, respectively, and 4 % at 200 μM H_2O_2 . The cytolethal potency of both organic peroxides was considerably higher than that of H_2O_2 . The increase in the percentage of apoptotic cells was, however, only statistically significant after exposure to H_2O_2 .

Coincubation with quercetin (10-50 μM) prevented in a concentration dependent manner C6 cells from necrotic cell death induced by 100 μM CHP and tert-BuOOH, respectively, or 20 mM H_2O_2 . Quercetin alone induced apoptosis in about 6 % of the cells.

Preincubation with α -tocopherol (5-50 μM) prevented C6 cells from necrotic cell death induced by organic peroxides. Moreover, it resulted in an increased induction of apoptosis by otherwise necrotic concentrations of hydroperoxides. The cytolethal potency of H_2O_2 was not affected by α -tocopherol.

Continuous oxidative stress generated by the H_2O_2 -production by means of the enzyme glucoseoxidase resulted exclusively in necrotic cell death. Apoptosis, identified by typical morphological features of the nuclei and caspase-3-activation, could not be detected at any timepoint.

To conclude, bolus application causes predominantly and continuously generated H_2O_2 exclusively necrotic cell death in C6 cells. Antioxidants prevent the peroxide induced cell death in C6 cells. α -Tocopherol prevents only necrotic cell death induced by organic peroxides and concomitantly induces an increase in apoptotic cell death. In other words, in certain population of cells α -tocopherol can switch the kind of peroxide-induced cell death from necrotic to apoptotic.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Abstract	5
Abkürzungsverzeichnis	15
1 Einleitung	17
1.1 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies	17
1.2 Konzentrationsabhängige Wirkungen reaktiver Sauerstoffspezies . . .	19
1.2.1 Apoptose und Nekrose	20
1.3 Zielsetzung	23
2 Material und Methoden	26
2.1 Chemikalien und Lösungen	26
2.1.1 Chemikalien	26
2.1.2 Pufferlösung	27
2.2 Geräte und Hilfsmittel	28
2.3 Zellkultur	31
2.3.1 C6-Zellen	31
2.3.2 Kulturmedien	31
2.3.3 Kultivierung	32
2.3.4 Auftauen der Zellen	32
2.4 Testsubstanzen	33
2.5 Versuchsaufbau	33
2.5.1 96-Well-Mikrotiterplattenkulturen	33
2.5.1.1 Zytotoxizität von Peroxiden	34

Inhaltsverzeichnis

2.5.1.2	Induktion von oxidativem Stress durch Peroxide . . .	34
2.5.2	100 mm Schalenkulturen	34
2.5.2.1	Wirkung von Peroxiden auf C6-Zellen in proliferati- onsgehemmten Kulturen	35
2.5.2.2	Wirkung von Peroxiden auf C6-Zellen in proliferie- renden Kulturen	35
2.5.2.3	Wirkung von Antioxidantien	36
2.5.2.4	Wirkung einer kontinuierlichen H ₂ O ₂ -Exposition . . .	37
2.6	Meßmethoden	39
2.6.1	Proteinbestimmung	39
2.6.2	Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies	41
2.6.3	Quantifizierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen . .	45
2.6.3.1	Ernten und Aufbereiten der Zellen	45
2.6.3.2	Untersuchung der Zellkernmorphologie	46
2.6.3.3	Bestimmung der Caspase-3-Aktivität	51
2.6.4	Bestimmung von H ₂ O ₂	54
2.7	Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse	57
3	Ergebnisse	58
3.1	Einflüsse des Ernteverfahrens	58
3.2	Auslösung des Zelltods durch Staurosporin	60
3.2.1	Morphologie der Zellen	60
3.2.2	Zellkernmorphologie	64
3.2.3	Proteingehalt der Kulturen	68
3.2.4	Caspase-3-Aktivität	69
3.2.5	Übersicht über die zeitabhängigen Effekte von Staurosporin .	70
3.3	Peroxid-induzierter Zelltod	73
3.3.1	Zytotoxizität von H ₂ O ₂ , CHP und tert-BuOOH	73
3.3.2	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Peroxide	76
3.3.3	Untersuchung des Wasserstoffperoxid-induzierten Zelltods . .	78
3.3.3.1	Zelltod in Abhängigkeit von der eingesetzten H ₂ O ₂ - Konzentration	78
3.3.3.2	Einfluss der Expositionszeit	83

Inhaltsverzeichnis

3.3.4	Untersuchung des durch organische Peroxide ausgelösten Zelltods	88
3.3.4.1	Konzentrationsabhängige Wirkungen der organischen Peroxide	88
3.3.4.2	Zeitabhängige Wirkungen organischer Peroxide . . .	94
3.4	Einfluss von Antioxidantien auf den Peroxid-induzierten Zelltod . . .	100
3.4.1	Einfluss von Quercetin auf den Peroxid-induzierten Zelltod . .	100
3.4.2	Einfluss von α -Tocopherol auf den Peroxid-induzierten Zelltod	112
3.5	Zelltod durch permanenten oxidativen Stress	119
4	Diskussion	129
4.1	Auslösung und Nachweis des apoptotischen Zelltods in C6-Zellen mit Staurosporin	130
4.1.1	Staurosporin	130
4.1.2	Charakterisierung des Staurosporin-induzierten Zelltods . . .	131
4.1.2.1	Morphologie der Zellen	132
4.1.2.2	Zellkernmorphologie und Chromatinkondensation . .	132
4.1.2.3	Caspase-3-Aktivität	133
4.1.2.4	Zeitabhängige Effekte	135
4.2	Charakterisierung des Peroxid-induzierten Zelltods	136
4.2.1	Zytotoxizität der Peroxide	136
4.2.2	Radikalbildung durch Peroxide	138
4.2.3	Nekrotischer und apoptotischer Zelltod durch Peroxide	138
4.2.4	Wirkung von Wasserstoffperoxid	139
4.2.5	Wirkung der organischen Peroxide CHP und tert-BuOOH . .	142
4.3	Einfluss von Antioxidantien auf den Peroxid-induzierten Zelltod . . .	144
4.3.1	Quercetin	144
4.3.2	α -Tocopherol	146
4.4	Wirkungen von kontinuierlichem oxidativen Stress	149
	Vorträge und Poster	169
	Danksagung	170

Inhaltsverzeichnis

Lebenslauf	171
Ehrenwörtliche Erklärung	172

Tabellenverzeichnis

3.1	Zytotoxische Potenz von H_2O_2 , CHP und tert-BuOOH	75
3.2	H_2O_2 -Produktionsraten in Abhängigkeit von der eingesetzten Glucoseoxidase-Konzentration	121

Abbildungsverzeichnis

2.1	Glucoseoxidase-Reaktion	37
2.2	Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Proteinbestimmung . . .	41
2.3	Umwandlungsschema des H ₂ -DCF-DA zum fluoreszierenden DCF . .	42
2.4	Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies	44
2.5	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von C6-Zellkernen	49
2.6	Übergang eines apoptotischen Kerns zu einem spätapoptotischen Kern	50
2.7	Belegung einer Mikrotiterplatte zur Bestimmung der Caspase-3-Ak- tivität	53
2.8	Belegung einer Mikrotiterplatte zur Bestimmung von H ₂ O ₂	55
3.1	Einfluss des Ernteverfahrens	59
3.2	Morphologische Veränderungen von C6-Zellen nach Staurosporin-Ex- position mit 0,1 µg/ml und 1 µg/ml	62
3.3	Zeitliche Abfolge morphologischer Veränderungen von C6-Zellen nach Staurosporin-Behandlung	63
3.4	Kernfärbung nach Staurosporin-Exposition	66
3.5	Induktion von Apoptose und Nekrose durch Staurosporin in C6-Zellen	67
3.6	Zellverlust durch Staurosporin-Exposition	68
3.7	Induktion von Apoptose und Aktivierung der Caspase-3 in C6-Zellen durch Staurosporin	69
3.8	Zytoletale Wirkung von Staurosporin und Aktivierung der Caspase-3 .	72
3.9	Zytotoxizität der Peroxide	74
3.10	Radikalbildung ausgelöst durch H ₂ O ₂ , CHP und tert-BuOOH	77

Abbildungsverzeichnis

3.11 Konzentrationsabhängigkeit der zytoletalen Wirkung von H ₂ O ₂ auf wachstumsgehemmte C6-Zellen	81
3.12 Konzentrationsabhängigkeit der zytoletalen Wirkung von H ₂ O ₂ auf proliferierende C6-Zellen	82
3.13 Zeitabhängige Wirkungen von Wasserstoffperoxid	85
3.14 Zeitabhängige Wirkungen von Wasserstoffperoxid auf den apoptotischen Zelltod	86
3.15 Kernfärbung nach Wasserstoffperoxid-Exposition	87
3.16 Konzentrationsabhängigkeit der zytoletalen Wirkung von CHP auf wachstumsgehemmte C6-Zellen	89
3.17 Konzentrationsabhängigkeit der zytoletalen Wirkung von tert-BuOOH auf wachstumsgehemmte C6-Zellen	90
3.18 Konzentrationsabhängigkeit der zytoletalen Wirkung von CHP auf proliferierende C6-Zellen	92
3.19 Konzentrationsabhängigkeit der zytoletalen Wirkung von tert-BuOOH auf proliferierende C6-Zellen	93
3.20 Zeitabhängige Wirkungen von tert-BuOOH	95
3.21 Zeitabhängige Wirkungen von CHP	96
3.22 Zeitabhängige Wirkungen von tert-BuOOH auf den apoptotischen Zelltod	98
3.23 Zeitabhängige Wirkungen von CHP auf den apoptotischen Zelltod	99
3.24 Induktion von Apoptose und Nekrose durch Quercetin	101
3.25 Einfluss von Quercetin auf die zytotoxische Wirkung von Wasserstoffperoxid	103
3.26 Einfluss von Quercetin auf die zytotoxische Wirkung von CHP	105
3.27 Einfluss von Quercetin auf die zytotoxische Wirkung von tert-BuOOH	106
3.28 Zytoprotektive Wirkung von Quercetin	108
3.29 Einfluss von Quercetin auf H ₂ O ₂ induzierte Apoptose	110
3.30 Vergleich der Wirkungen von Quercetin bei unterschiedlichen Kulturbedingungen	111
3.31 Einfluss von α -Tocopherol auf die zytotoxische Wirkung von H ₂ O ₂	114
3.32 Einfluss von α -Tocopherol auf die zytotoxische Wirkung von CHP	115

Abbildungsverzeichnis

3.33 Einfluss von α -Tocopherol auf die zytotoxische Wirkung von tert-BuOOH	116
3.34 Zytoprotektive Wirkung von α -Tocopherol	118
3.35 Wasserstoffperoxidproduktion durch Glucoseoxidase in Abwesenheit von Zellen	120
3.36 H_2O_2 -Konzentrationen bei Inkubation von C6-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Glucoseoxidase	123
3.37 Zelltod in Abhängigkeit von den eingesetzten Glucoseoxidase-Konzentrationen	127
3.38 Zelltod durch Exposition gegenüber kontinuierlich gebildetem H_2O_2 .	128

Abkürzungsverzeichnis

Abk.	Abkürzung
AIF	Apoptose initiierender Faktor
APAF-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
ATP	Adenosintriphosphat
Bid	BH3 interacting domain death agonist
CAD	Caspase-aktivierte DNase
CHP	Cumolhydroperoxid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
FADD	Fas assoziiertes Protein mit Todesdomäne
FBS	Fetales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
NGF	Nervenwachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
p-NA	p-Nitroanilin
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
tert-BuOOH	tertiäres Butylhydroperoxid
TNF	Tumornekrosefaktor

Abkürzungsverzeichnis

TRADD	TNF-Rezeptor assoziiertes Protein mit Todesdomäne
ICAD	Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase

1 Einleitung

1.1 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies

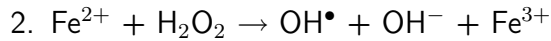
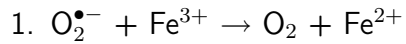
Oxidativer Stress wurde von Sies (1991) als Störung im Verhältnis von Oxidans zu Antioxidans definiert. Dieses Missverhältnis kann zu oxidativen Schäden von Biomolekülen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) führen und wird entweder durch eine Überproduktion freier Radikale oder durch eine Störung des intrazellulären, antioxidativen Schutzsystems verursacht (Halliwell und Whiteman, 2004).

Unter dem Begriff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden sowohl sauerstoffhaltige Radikale, wie Superoxidradikalanionen, Hydroxylradikale und Alkoxyradikale als auch nicht-radikalische, sauerstoffhaltige Verbindungen, wie Wasserstoffperoxid, zusammengefasst. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden während zahlreicher biologischer Prozesse gebildet. So wird das Superoxidradikalanion in vivo durch die NADPH-Oxidase in phagozytierenden Zellen produziert. Es entsteht aber auch durch Autoxidationsvorgänge und in geringen Mengen durch die Reaktion von Sauerstoff mit dem zweiwertigen Eisen im Häm-Protein (Halliwell, 2007). Die wichtigste Quelle für das Superoxidradikalanion ist jedoch die mitochondriale Elektronentransportkette (Balaban et al., 2005).

Superoxiddismutase wandelt das Superoxidradikalanion in Wasserstoffperoxid um (Fridovich, 1997). Das gebildete H_2O_2 kann wiederum durch die mitochondriale Glutathionperoxidase zu Wasser reduziert werden oder es diffundiert ins Zytosol.

1 Einleitung

Das Superoxidradikalanion und H_2O_2 können in der von Haber und Weiß beschriebenen Reaktion mit Übergangsmetallionen hoch reaktive Hydroxylradikale bilden:



Bei der zweiten Reaktion handelt es sich um die klassische Fenton Reaktion, bei der aus H_2O_2 in Gegenwart von Eisen-(2)-Salzen Hydroxylradikale gebildet werden. Darüber hinaus werden Hydroxylradikale auch durch Reaktion von H_2O_2 mit anderen Metallionen wie zum Beispiel Kupfer-(1)-Salzen gebildet (Halliwell und Gutteridge, 1985). Das Superoxidradikalanion und H_2O_2 sind weit weniger reaktiv als das Hydroxylradikal, welches meist direkt an seinem Entstehungsort mit nahezu jedem Biomolekül reagiert (Halliwell und Gutteridge, 1985). Lipidhydroperoxide entstehen durch die Peroxidation von Lipiden. Die organischen Peroxide CHP und tert-BuOOH stellen kurzkettige Analoga zu Lipidhydroperoxiden dar.

Reaktive Sauerstoffspezies können eine Reihe von oxidativen Schäden in der Zelle verursachen. Sie können beispielsweise den Funktionsverlust von Enzymen zur Folge haben. So inaktiviert das Superoxidradikalanion Eisen-Schwefel tragende Proteine, wie die Aconitase oder NADH-Dehydrogenase (Ott et al., 2007).

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie sie in Zellmembranen vorkommen, werden durch freie Radikale zu Lipidperoxiden oxidiert (Halliwell und Chirico, 1993). Die Schädigung von Membranlipiden durch Lipidperoxidation führt zu einer Verringerung der Membranfluidität und einer Erhöhung der Durchlässigkeit für Substanzen, die normalerweise nur durch spezifische Kanäle eingelassen werden (Richter, 1987). Für die gebildeten Oxidationsprodukte der Lipidperoxidation, wie Malondialdehyd, 4-Hydroxy-3-transnonenal und Acrolein, wurden Reaktionen mit anderen Proteinen nachgewiesen, die deren Struktur und Funktion verändern (Pocernich et al., 2001, Subramaniam et al., 1997). Wichtige Funktionen der Mitochondrien, wie die Atmungskette, der Erhalt des mitochondrialen Membranpotentials und der Calcium-Homöostase werden durch Lipidperoxide beeinträchtigt (Zhang et al., 1990, Albano

et al., 1991, Ott et al., 2007). Reaktive Sauerstoffspezies verursachen oxidative Veränderungen der Purin- und Pyrimidin-Basen und der Desoxyribose der DNA. Sie führen zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Schraufstatter et al., 1986) und Mutationen (Evans et al., 2004). Auch die mitochondriale DNA, welche wichtige Proteine der Atmungskette codiert, stellt ein Ziel für ROS dar.

Um sich vor den Folgen oxidativen Stresses zu schützen, verfügt die Zelle über ein antioxidatives Schutzsystem. Gemäß Halliwell (1995) ist ein Antioxidans als jedwede Substanz definiert, die im Verhältnis zum Substrat in vergleichsweise kleinen Konzentrationen den Oxidationsprozess des Substrats entweder deutlich verlangsamt oder verhindert. Die antioxidativen Schutzmechanismen der Zelle lassen sich in enzymatische und nicht enzymatische Abwehrmechanismen unterteilen. Zu den wichtigsten Enzymen, die reaktive Sauerstoffspezies umsetzen, gehören Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase, wobei die organischen Peroxide CHP und tert-BuOOH im Gegensatz zu H_2O_2 nur durch die Glutathionperoxidase abgebaut werden (Dringen et al., 1999). Zu den nicht enzymatischen Abwehrmechanismen gehören wasserlösliche Stoffe wie Glutathion, Ascorbinsäure oder lipidlösliche Stoffe wie α -Tocopherol, Bilirubin und Ubiquinol. Diese Stoffe agieren als Radikalfänger. Ein Proton oder ein Elektron wird dabei vom Antioxidans auf das Radikal übertragen, wodurch aus dem freien Radikal ein relativ stabiles Produkt gebildet wird. Das Antioxidans wird während dieser Reaktion selbst oxidiert. Die oxidierte Form des Antioxidans muss nun selbst wieder in die reduzierte Form überführt werden. Dies geschieht durch ein Netzwerk von Antioxidantien, welche sich gegenseitig zu reduzieren vermögen (Boots et al., 2008).

1.2 Konzentrationsabhängige Wirkungen reaktiver Sauerstoffspezies

Die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress kann in Abhängigkeit von der Höhe auf zellulärer Ebene unterschiedliche Wirkungen hervorrufen. So können niedrige H_2O_2 -Konzentrationen in einer Reihe von Zelllinien das Wachstum stimulieren (Burdon, 1995). Höhere Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies können diverse Strukturen der

Zelle, wie z.B. die DNA, Proteine und Lipide, schädigen (vgl. oben). Ist der durch reaktive Sauerstoffspezies entstandene oxidative Schaden sehr groß, kann dies zum Zelltod führen, welcher im wesentlichen durch zwei Mechanismen, Nekrose oder Apoptose, erfolgen kann.

1.2.1 Apoptose und Nekrose

Nekrose, der sogenannte „Unfalltod“ der Zelle, tritt auf, wenn Zellen durch extreme, äußere Einflüsse, wie z.B. mechanische Schädigung oder Sauerstoffmangel, zu Grunde gehen. Nekrose ist ein relativ passiver Vorgang, bei dem die Zelle zunächst durch einen Ausfall der zellulären Ionenpumpen die Fähigkeit verliert, die Homöostase aufrecht zu erhalten. Dadurch kommt es zu einem Einstrom von Ionen und Wasser, wodurch die Zellorganellen und die Zelle stark anschwellen und schließlich platzen. Durch die Zerstörung der Zellmembran dringt der gesamte zelluläre Inhalt einschließlich der lysosomalen Enzyme in den Extrazellularraum ein, was zu einer Schädigung der benachbarten Zellen führt. Durch den austretenden Zellinhalt werden Immunzellen angelockt, die durch das Ausschütten von Entzündungsmediatoren eine Entzündungsreaktion hervorrufen und das umliegende Gewebe weiter schädigen (Wyllie, 1997; Robertson und Orrenius, 2000).

Apoptose ist die physiologische Form des Zelltods, bei dem sich die Zelle durch einen aktiven Prozess als Antwort auf physiologische oder pathologische Stimuli, selbst abschaltet. Der Begriff Apoptose wurde 1972 von Kerr, Wyllie und Currie eingeführt, um die charakteristischen, morphologischen Veränderungen der Zelle während des sogenannten programmierten Zelltods zu beschreiben. Apoptose dient in ergänzender, aber entgegengesetzter Richtung zur Mitose, der Regulierung der Gewebshomöostase (Kerr et al., 1972) und spielt unter physiologischen Bedingungen bei der Organentwicklung, als Abwehrmechanismus und bei Alterungsprozessen eine Rolle (Vaux und Strasser, 1996).

Apoptose kann durch unterschiedlichste Stimuli ausgelöst werden. Ionisierende Strahlung, osmotischer Schock, DNA-schädigende Chemikalien, wie sie in der Tumorthherapie eingesetzt werden, oder der Entzug von Wachstumsfaktoren bzw. Überlebensfaktoren können Apoptose auslösen (Jarpe et al., 1998). Jüngere Untersuchungen erga-

1 Einleitung

ben, dass ROS beispielsweise eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Proteinen spielt, welche die Caspasen aktivieren und Apoptose einleiten. Cytochrom c ist über das anionische Phospholipid Cardiolipin an die innere Mitochondrienmembran gebunden. Die Oxidation von Cardiolipin schwächt die Bindung von Cytochrom c und führt zu einer erhöhten Konzentration von Cytochrom c im mitochondrialen Zwischenraum, bevor es durch Poren, welche durch proapoptotische Proteine in der äußeren Mitochondrienmembran gebildet werden, ins Zytoplasma wandert (Ott et al., 2007).

Während der Apoptose trennt sich die sterbende Zelle aus dem Zellverband. Es kommt zu einem Schrumpfen von Zytoplasma und Zellkern. Das Chromatin verdichtet sich und lagert sich dabei vornehmlich an der Kernmembran an, wo es schließlich in mehrere Teile zerfällt. Dies wird als Zellkernfragmentierung sichtbar. Eine Endonuklease zerschneidet die DNA an bestimmten Stellen zwischen den Nukleosomen in mono- und oligonukleosomale Bruchstücke (Enari et al., 1998). Im weiteren Verlauf bilden sich Ausstülpungen und Bläschen an der Zytoplasmamembran („blebbing“), welche sich schließlich als membranumhüllte Vesikel, die auch als apoptotische Körperchen bezeichnet werden, von der Zelle abschnüren. In vivo wird die apoptotische Zelle nach und nach von spezialisierten Phagozyten oder auch durch lebende Nachbarzellen phagozytiert. Die Phagozyten erkennen apoptotische Zellen an Membranveränderungen, wie z.B. der Umlagerung von Phosphatidylserin von der Membrannenseite auf die Außenseite. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt bei der Apoptose die Membranintegrität über lange Zeit erhalten, wodurch auch das umliegende Gewebe bei der Apoptose nicht in Mitleidenschaft gezogen wird. In vitro, wo phagozytierende Zellen fehlen, schwellen die apoptotischen Zellen nach ihrer anfänglichen Verdichtung in den nachfolgenden Stunden wieder an. Die Membranen werden durchlässig für Farbstoffe wie Trypanblau oder Propidiumjodid und zerfallen. Diese Endphase des apoptotischen Zelltods in vitro wird auch als sekundäre Nekrose bezeichnet (Wyllie, 1997).

Verschiedene Proteasen, die bekanntesten sind die Caspasen, sind am apoptotischen Zelltod beteiligt (Alnemri et al., 1996). Caspasen tragen in ihrem aktiven Zentrum ein Cystein und spalten ihre Substrate hinter Aspartatresten. Daher leitet sich ihr Name ab (Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen). In der Zelle liegen die Caspasen

1 Einleitung

als inaktive Vorstufen, sogenannte Procaspasen, vor, welche durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Die Caspasen aktivieren sich in einer komplexen Kaskade gegenseitig, wobei die Initiator-Caspasen nachgeschaltete Effektor-Caspasen aktivieren. Die Aktivierung der Initiatorcaspasen (z.B. Caspase 6, 8, 9 und 10) kann einerseits Rezeptor-vermittelt über ein äußeres (extrinsisches) Signal oder über die Mitochondrien durch ein inneres (intrinsisches) Signal erfolgen.

Beim extrinsischen Weg erfolgt die Aktivierung über die sogenannten membranständigen Todesrezeptoren, wie FAS (CD95, Apo-1) oder TNF-R. Die Todesrezeptoren trimerisieren nach Bindung eines Todesliganden. Nach der Trimerisierung des Todesrezeptors binden die Adaptormoleküle TRADD und FADD an die Todesdomäne des Rezeptors auf der Zellinnenseite. An FADD bindet wiederum die Initiator-Procaspase-8, die durch autolytische Spaltung aktiviert wird. Caspase-8 aktiviert die Effektor-Caspase-3 (Peter und Krammer, 1998). Caspase-3 aktiviert ihrerseits andere Effektor-Caspasen, wie Caspase-6 und Caspase-7. Diese aktivieren wiederum signalverstärkend Caspase-8. Caspase-8 kann auch über die Spaltung des im Zytosol befindlichen Proteins Bid den intrinsischen Weg zur Signalverstärkung nutzen. Caspase-3 nimmt in der Caspasekaskade eine zentrale Position ein und ist an vielen Prozessen während der Apoptose beteiligt, wie der DNA-Fragmentierung, am Blebbing und der Spaltung von Substratproteinen (Porter und Jänicke, 1999). Eines dieser Substrate ist der Inhibitor einer Endonuclease (ICAD = inhibitor of caspase-activated DNase), welcher nach Abspaltung durch Caspase-3 die Endonuclease (CAD = caspase-activated DNase) freigibt. Diese wandert aus dem Zytoplasma in den Zellkern, um dort die DNA in oligonukleosomale Fragmente zu spalten (Enari et al., 1998). Darüber hinaus spaltet die Caspase-3 das DNA-Reparatur-Enzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) (Nicholson et al., 1995). Beim intrinsischen Weg über die Mitochondrien kommt es durch einen Stimulus zur Freisetzung von Cytochrom c in das Zytosol. Dort bindet Cytochrom c an APAF-1 (Apoptotischer Protease Aktivierungsfaktor-1). Nach Bindung von dATP und Oligomerisierung mit weiteren APAF-Molekülen rekrutiert jedes APAF-Molekül eine Initiator-Procaspase-9 aus dem Zytosol. Dieser Komplex wird als Apoptosomen bezeichnet (Acedo et al., 2002). Die aktivierte Caspase-9 wird aus dem Apoptosomen entlassen und aktiviert nun selbst die Effektorcaspasen 3 und 7 (Saleh et al., 1999).

1.3 Zielsetzung

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde die permanente Rattengliomzelllinie C6 verwendet. Die C6-Zellen entstammen einem Gliom der Wistar-Ratte, welches durch die wiederholte Gabe von N-Nitrosomethylharnstoff über einen Zeitraum von 8 Monaten induziert wurde (Benda et al., 1968). Histopathologisch ist der Tumor als Astrozytom klassifiziert und gehört nach der American Type Culture Collection zu den Gliatumoren (Barth und Kaur, 2009). Daher können die C6-Zellen auch als Astrogliomazellen klassifiziert werden. Bei den C6-Zellen handelt es sich um Glioblasten, d.h. um noch nicht ausdifferenzierte Gliazellen. Zyklisches Adenosinmonophosphat bewirkt die Differenzierung der C6-Zellen zu Astrozyten (Davies und Vernadakis, 1986). Zwei Gründe haben zur Verwendung von C6-Zellen in dieser Arbeit geführt.

Zum einen werden die C6-Zellen in zahlreichen Arbeiten als experimentelles Modellsystem zur Aufklärung von Mechanismen verwendet, welche für das Wachstum, die Angiogenese und Infiltration des zentralen Nervensystems mit Glioblastomzellen verantwortlich sind, sowie zur Entwicklung von Ansätzen zur Therapie dieses sehr aggressiven und in den meisten Fällen therapieresistenten Tumors (Grobbs et al., 2002). Das Verhalten der C6-Zellen unter oxidativem Stress, wie dieser auch durch freie Radikale während der Chemotherapie erzeugt wird, liefert daher neue Erkenntnisse, die einen Beitrag zur Findung von Therapieansätzen liefern könnten.

Zum anderen wird oxidativer Stress mit einer Reihe neurologischer Erkrankungen in Verbindung gebracht, wie Alzheimer (Butterfield et al., 2001) oder Parkinson (Zecca et al., 2004). Desagher et al. (1996) beschrieben, dass Astrozyten Neurone vor der toxischen Wirkung von H_2O_2 schützen können. C6-Astrogliomazellen sind in zahlreichen Arbeiten anstelle von primär zu kultivierenden Astrozyten zur Untersuchung neurotoxischer Wirkungen verschiedenster Substanzen verwendet worden (Cookson et al., 1998; Zielinska et al., 2003; Seibert et al., 2004; Rüdeler et al., 2009). Die C6-Zellen werden daher auch in dieser Arbeit anstelle von Astrozyten als Modell zur Untersuchung der Wirkung von oxidativem Stress herangezogen. Anzumerken ist, dass die absolute Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Zelltypen nicht immer

1 Einleitung

gewährleistet ist. So ergaben sich bei der Untersuchung der zytotoxischen Wirkungen von Organozinnverbindungen Unterschiede zwischen primär kultivierten Astrozyten und C6-Zellen. In der Arbeit von Seibert et al. (2004) erwiesen sich die C6-Zellen als sensibler.

In einem Artikel von Davies (1999) werden in Abhängigkeit von der Höhe des oxidativen Stresses unterschiedliche Wirkungen auf zellulärer Ebene beschrieben. Danach stimulieren sehr niedrige Konzentrationen von H_2O_2 (3–15 μM) das Zellwachstum und die Zellteilung. Höhere Konzentrationen (120–150 μM) bewirken einen temporären Wachstumsstopp, welcher bei noch höheren Konzentrationen (250–400 μM) in einen permanenten Wachstumsstopp übergeht. Durch Konzentrationen von 0,5–1 mM wird Zelltod durch Apoptose eingeleitet. Höhere Konzentrationen (5–10 mM) lösen Nekrose aus. Lennon et al. (1991) zeigten durch Versuche mit HL-60-Zellen, dass ein eher niedriger Zelltod-auslösender Stimulus Apoptose auslöst, während hohe Konzentrationen Nekrose zur Folge hatten. Oder anders gesagt, bei kleinen Zellschäden ist die Zelle in der Lage Apoptose einzuleiten, während Nekrose nach einer schweren Beschädigung der Zelle auftritt. In Abhängigkeit von der Konzentration und vom Zelltyp ist auch von Lee und Shacter (1999) für H_2O_2 entweder Zelltod durch Apoptose oder Nekrose beschrieben worden, wobei der nekrotische Zelltod hauptsächlich bei höheren Konzentrationen auftrat. In dieser Arbeit sollte daher die Rolle von Konzentration und Zeit bei der Auslösung von Zelltod durch oxidativen Stress untersucht werden. Ziel ist es herauszufinden, welcher Zelltod in Abhängigkeit von der Höhe des oxidativen Stresses ausgelöst wird.

Zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies und damit von oxidativem Stress *in vitro* wurden die Peroxide H_2O_2 , CHP und tert-BuOOH verwendet. Die Peroxide wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Zielstrukturen innerhalb der Zelle gewählt, um mögliche Unterschiede in ihrer zytotoxischen Wirkung feststellen zu können. H_2O_2 durchdringt als unpolares Molekül die Zellmembran und reagiert mit einer Vielzahl von intrazellulären Strukturen. So wurden durch die Behandlung von Zellen mit H_2O_2 DNA-Strangbrüche (Schraufstatter et al., 1986), Aktivierung der PARP (Lee et al., 2001), Oxidation von Proteinen (Stadtman, 2006) und Entleerung der ATP-Speicher (Schraufstatter et al., 1986) nachgewiesen. Die organischen Peroxide CHP und tert-BuOOH werden in der Eisen-abhängigen Fenton-Reaktion zu Alkoxyradikalen

1 Einleitung

umgewandelt. Aufgrund des lipophileren Charakters der Alkoxyradikale ist deren Wirkung vornehmlich auf Membranen gerichtet. Tert-BuOOH und CHP verursachen Lipidperoxidation (Linden et al., 2008).

Als weitere Fragestellung sollte der Einfluss der natürlich vorkommenden Antioxidantien α -Tocopherol und Quercetin auf den Peroxid-induzierten Zelltod untersucht werden. Die antioxidative Wirkung des lipophilen α -Tocopherols beruht auf der Reaktion mit den Alkoxyradikalen und Peroxylradikalen mehrfach ungesättigter Fettsäuren, wodurch die Kettenreaktion der Lipidperoxidation unterbrochen werden kann. Dabei entsteht aus α -Tocopherol selbst ein Radikal, welches mit Ascorbinsäure oder Glutathion wieder in die reduzierte Form rückgeführt werden kann. Quercetin, ein natürlich vorkommendes Flavonoid, welches reichlich in Zwiebeln und Tee vorkommt (Scalbert und Williamson, 2000), besitzt durch seine Struktur ausgezeichnete Eigenschaften als Radikalfänger. Durch Arbeiten von Zielinska et al. (2003) und Park et al. (2009) sowie noch unveröffentlichten Ergebnissen aus unserem Labor wurde belegt, dass die genannten Antioxidantien in der Lage sind Zellen vor den zytotoxischen Wirkungen organischer Peroxide zu schützen. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob die Antioxidantien auch einen modulierenden Effekt auf den Zelltod haben können, d.h. ob sie neben der protektiven Wirkung auch die Art des Zelltods verändern können.

Als letzter Punkt sollten die Wirkungen von kontinuierlichem oxidativen Stress auf C6-Zellen untersucht werden. Während des aeroben Metabolismus in Säugetierzellen werden kontinuierlich reaktive Sauerstoffspezies produziert. Die kontinuierliche Exposition mit Peroxiden würde daher im Gegensatz zu den in vielen Arbeiten untersuchten Bolus-Gaben In-vivo-Bedingungen in geeigneterer Weise wiedergeben (Dringen et al., 1999, Barbouti et al., 2002). In dieser Arbeit soll untersucht werden, auf welche Weise C6-Zellen bei kontinuierlicher Exposition mit H_2O_2 in Abhängigkeit von der Konzentration und der Expositionsdauer sterben.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungen

2.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
D-Glucose	Merck, Germany
2',7'-Dichlordihydrofluorescein-Diacetat (H ₂ DCF - DA)	Sigma, Germany
Calciumchlorid-2-Hydrat, krist.	Merck, Germany
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	Sigma
Cumolhydroperoxid (CHP), 88 %	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Germany
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Germany
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Fetales Rinder Serum (FBS)	Biochrom, Germany
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck
Fungizone (Amphotericin B 250 µg/ml)	Invitrogen
Gentamycin (10 mg/ml)	Invitrogen
Glucoseoxidase (211 U/mg)	Sigma
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck
Hoechst 33342 (Bisbenzimid)	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck

2 Material und Methoden

Kalium-Natriumtartrat	Merck
Kupfer-(2)-Sulfat-(5)-Hydrat	Merck
L-Glutamin (200 mM)	CCPro
Magnesiumchlorid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Propidiumjodid	Sigma
Rinderserumalbumin A-8022	Sigma
Rinderserumalbumin A-7906	Sigma
tert-Butylhydroperoxid 70 % (tert-BuOOH)	Sigma, Merck
Trypanblau	Merck
Trypsin-EDTA (10 x)(Trypsin 5,0 mg/ml; EDTA 2,2 mg/ml)	Gibco
Wasserstoffperoxid 30 % (H ₂ O ₂)	Sigma/Aldrich

2.1.2 Pufferlösung

PBS Puffer mit Ca / Mg

Lösung A:

NaCl	8000 mg/l
KCl	200 mg/l
Na ₂ HPO ₄	1150 mg/l
KH ₂ PO ₄	200 mg/l

Lösung B:

MgCl ₂ × 6 H ₂ O	100 mg/l
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	132 mg/l

Lösung A und B wurden getrennt voneinander hergestellt, um ein Ausfallen von Magnesium und Calcium zu verhindern. Der Puffer wurde zum Spülen bei der Pro-

2 Material und Methoden

teinbestimmung verwendet und zum Ansetzen der Glucoseoxidaselösung. Lösung A wurde zum Spülen der Erhaltungskulturen vor dem Trypsinisieren verwendet, sowie zum Verdünnen der Trypsinlösung und zum Waschen des Zellpellets bei der Zelllyse für die Caspase-3 - Aktivitätsbestimmung.

HANK's BALANCED SALT SOLUTION (HBSS)

CaCl ₂ × 2 H ₂ O	185 mg/l
KCl	400 mg/l
KH ₂ PO ₄	60 mg/l
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	100 mg/l
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	100 mg/l
NaCl	8000 mg/l
NaHCO ₃	350 mg/l
Na ₂ HPO ₄	48 mg/l
Glucose	1000 mg/l

HBSS wurde zum Ansetzen der Lösung der Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst und Propidiumjodid verwendet sowie zum Waschen der Zellen bei der H₂-DCF-DA-Methode.

2.2 Geräte und Hilfsmittel

Absauganlage	Pipetus® , Firma Hirschmann
Analysenwaage	AC210D, Firma Sartorius
Autoklaven	Firma Webeco GmbH
Brutschränke	Heraeus electronic, Firma Heraeus
Feinwaage	Firma Sartorius
Fluorimeter	Tecan GENios Pro, Firma Tecan
Gasbrenner	Gasprofi 1, WLD TEC
Gefrierschrank	Firma Liebherr, (-18°C)
Glasgefäße	Firma Schott

2 Material und Methoden

Kamera (Mikroskop Zeiss)	Power Shot A620, Firma Canon
Kamera (Mikroskop Olympus)	Olympus E-300, Firma Olympus
Kühlschrank	Firma Liebherr (+2 - +8°C)
Lichtmikroskope	Olympus IMT-2 (invers); Nikon Optiphot
Magnetrührer	Ikamag RET-GS
Fluoreszenzmikroskop	Phasenkontrast , IM 35, Photomikroskop III RS mit Fluoreszenzauflichtkondensor III RS, Objektiv Ph2 Neoflor 40 / 0,75; Firma Zeiss
pH- Elektrode	Inolab® 406, Firma Mettler Toledo
pH-Meter	WTW, pH422
Photometer	ELX800UV universal microplate reader, Firma Biotek Instruments
Pipetten	Research (10-100 µl / 100-1000 µl) Firma Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipettus® Standard, Firma Hirschmann
Reinstwasseranlage	ELGA Maxima
Schüttelinkubator	Inkubator 100 / Unimax1010, Firma Heidolph Instruments
Sterilbänke	Hera Safeund Lamin Air, Firma Heraeus
Sterilisator	T 5050 Heraeus, Firma Heraeus
Stickstofftank	35HL Union Carbide, Firma CryogenicEquipment
Trockenschrank	Omnilab, Firma Memmert
Wasserbad	Exatherm V3, electronic Julabo
Zählkammer	Thomae neu (0,1 mm Tiefe); Firma Assistent

2 Material und Methoden

Zentrifuge

Heraeus fresco 21, Firma Heraeus
Zentrifuge Mega 1.0 R, Firma
Heraeus

2.3 Zellkultur

2.3.1 C6-Zellen

Die Gliomazelllinie C6 wurde am 12.10.1999 in der Passage 37 von der American Type Culture Collection (ATCC, No. CCL-107) erworben. Die Zelllinie wurde von Benda et al. (1968) etabliert und stammt aus einem primären Rattenhirntumor, der durch N-Nitrosomethylharnstoff induziert wurde. Nach Erwerb wurden die C6-Zellen dreimal passagiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Versuche wurden Zellen der Passagen P46 - P60 verwendet.

2.3.2 Kulturmedien

Als Basismedium für die Erhaltungskulturen und die Versuche wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) verwendet. Das DMEM Basismedium wurde zusammen mit 3,7 g NaHCO_3 und 4,766 g HEPES in Reinstwasser gelöst, auf pH 7,4 eingestellt und sterilfiltriert. Für die Erhaltungskulturen und die Aussaat der Versuchskulturen enthielt das DMEM den pH-Indikator Phenolrot. Die Exposition der Versuchskulturen erfolgte in phenolrotfreiem DMEM, da Phenolrot bei den verschiedenen Bestimmungen zu Verfälschungen des Versuchsergebnisses führen könnte. An dieser Stelle sei außerdem darauf hingewiesen, dass das verwendete DMEM pyruvatfrei ist, da Pyruvat mit den Peroxiden in einer nicht enzymatischen Reaktion reagiert. Das Basismedium DMEM wurde für die Erhaltungskulturen und als Wachstumsmedium für die Versuchskulturen mit 5 % FBS (V/V) und Gentamycin in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml sowie Fungizone in einer Endkonzentration von 1,25 mg/ml verwendet. Die Zusammensetzung des Mediums bei Exposition entspricht bei Versuchen mit proliferierenden Zellen dem Medium für die Erhaltungskulturen. Für Versuche mit wachstumsgehemmten C6-Zellen wurde serumfreies Medium eingesetzt.

2.3.3 Kultivierung

Die Erhaltungskulturen wurden bei 37°C und 10 % CO₂-Spannung im Brutschrank kultiviert und einmal pro Woche passagiert. Zum Passagieren wurde das Erhaltungsmedium entfernt und die Zellen mit auf 37°C erwärmten PBS ohne Calcium/Magnesium gewaschen, um restliches FBS zu entfernen und die Zellen auf das Trypsinisieren vorzubereiten. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin- EDTA Lösung (1:10 in PBS verdünnt) für 30 Sekunden behandelt. Sobald sich der Zellrasen vom Boden der Kulturschale zu lösen begann, wurden die Zellen in 5 ml FBS-haltigem Medium aufgenommen und durch mehrmaliges Auf-und Abpipettieren vereinzelt. Vor der Aussaat wurde die Zellzahl pro Milliliter mit Hilfe der Thoma-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde die Zellsuspension mit dem Azofarbstoff Trypanblau (0,2 %) im Verhältnis 1:2 angefärbt. Trypanblau durchdringt dabei die Zellmembran toter Zellen und färbt diese tiefblau. Dadurch wurde das Mitzählen toter Zellen verhindert. Die Zellkonzentration für die Aussaat und die jeweiligen Versuche wurde durch Verdünnen mit FBS-haltigem Medium erzielt. In den Erhaltungskulturen wurden 100.000-200.000 Zellen pro Flasche (25 cm²) in 7 ml Medium ausgesät. In den höheren Passagen waren z.T. auch 50.000 Zellen ausreichend. Am zweiten und vierten Kulturtag fand zur Fütterung der Kulturen ein Mediumwechsel statt.

2.3.4 Auftauen der Zellen

Jeweils nach ca. 15 Passagen wurden neue Zellen einer niedrigen Passage aufgetaut. Die C6-Zellen wurden in FBS-haltigem DMEM mit einem Zusatz von 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Zum Auftauen wurden die sich in Kryoröhrchen befindlichen Zellen im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Anschließend wurden die Zellen 1:10 in phenolrothaltigem DMEM mit FBS aufgenommen, um das in dieser Konzentration zytotoxisch wirkende DMSO zu verdünnen. Die Zellen wurden bei 3000 RPM (1560 × g) und 5°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 14 ml phenolrothaltigem DMEM mit FBS aufgenommen und auf 2 Kulturflaschen mit jeweils 7 ml verteilt.

2.4 Testsubstanzen

Die Wirkung folgender Substanzen wurde untersucht:

Wasserstoffperoxid
Cumolhydroperoxid
tert-Butylhydroperoxid
Staurosporin
DL- α -Tocopherol
Quercetin

Alle Substanzen wurden im Kühlschrank bei 2-8°C gelagert. Für die Versuche wurden die Peroxide direkt im Medium angesetzt, während Staurosporin, DL- α -Tocopherol und Quercetin zunächst in Dimethylsulfoxid als Lösungsvermittler gelöst wurden. Um mögliche Wirkungen des DMSO auf die Zellen auszuschließen, betrug der Lösungsmittelanteil stets 0,2 %. Dies galt auch für die Kontrollen.

Um die Wirkungen von oxidativen Stress bei kontinuierlicher Produktion von Wasserstoffperoxid zu untersuchen, wurde das Enzym Glucoseoxidase eingesetzt, welches aus Glucose und Sauerstoff Wasserstoffperoxid bildet. Die von der Firma Sigma bezogene Glucoseoxidase hat eine Aktivität von 211 Units pro mg Enzym. Eine Unit wurde als die Enzymmenge definiert, die 1 μ mol Glucose pro Minute bei pH 7 und 25°C oxidiert. Das Pulver der Glucoseoxidase wurde bei -18°C gelagert. Für den Versuch wurde das Enzym in eiskaltem PBS mit Ca / Mg gelöst.

2.5 Versuchsaufbau

2.5.1 96-Well-Mikrotiterplattenkulturen

Die Versuche wurden mit Kulturen wachstumsgehemmter C6-Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Hemmung des Wachstums wurde durch die Kultivierung in serumfreien DMEM erreicht.

2.5.1.1 Zytotoxizität von Peroxiden

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der Peroxide wurden am Tag 1 40.000 Zellen pro Well in 200 μ l serumhaltigem DMEM mit Phenolrot in einer 96-Well-Platte ausgesät. Die äußeren Wells (Abb. 2.2: Reihen A und H sowie die Spalten 1, 4, 11 und 12) wurden nur mit 200 μ l Kulturmedium/Well befüllt. 24 h nach der Aussaat erfolgte die Exposition mit dem jeweiligen Peroxid unter proliferationshemmenden Bedingungen. Dazu wurden die 96-Well-Platten zweimal mit 200 μ l serum- und phenolrotfreiem DMEM gespült, um alles FBS gründlich zu entfernen. Anschließend wurden die Wells mit Zellen mit 6 verschiedene Konzentrationen des zu testenden Peroxids in einem Volumen von 200 μ l beschickt. Die Kontrollen erhielten nur Medium. Die Verdünnungsreihen für die Peroxide wurden in phenolrotfreiem DMEM frisch hergestellt und die Stammlösung sterilfiltriert. Die Exposition begann zu dem Zeitpunkt, zu dem die Mikrotiterplatten in den Brutschrank gestellt wurden und endete mit dem Herausnehmen der Platten. Zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Peroxidtoxizität wurden mehrere Platten gleichzeitig mit verschiedenen Peroxid-Konzentrationen behandelt und nach den Zeiträumen 1 h, 2 h, 4 h, 24 h, 48 h aus dem Brutschrank entnommen. Nach Beendigung der Exposition wurde wie unter 2.6.1 beschrieben der Zellproteingehalt pro Well bestimmt.

2.5.1.2 Induktion von oxidativem Stress durch Peroxide

Zur Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies wurden 40.000 Zellen/Well in schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatten der Firma Greiner mit durchsichtigem Boden (black wall, clear bottom) in phenolrotfreiem DMEM + FBS ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Weiterbehandlung der Platte wie unter Punkt 2.6.2 beschrieben.

2.5.2 100 mm Schalenkulturen

Die Versuche in den 100 mm Schalenkulturen wurden sowohl mit wachstumsgemmten als auch mit proliferierenden C6-Zellen durchgeführt.

2.5.2.1 Wirkung von Peroxiden auf C6-Zellen in proliferationsgehemmten Kulturen

Am Tag 1 wurden 1×10^6 C6-Zellen pro 100 mm Schale (Sarstedt) in serumhaltigem DMEM mit Phenolrot ausgesät. Am vierten Kulturtag wurden die Zellen jeder Schale mit 10 ml phenolrot- und serumhaltigem Medium gefüttert. Am sechsten Kulturtag wurden die Zellen zweimal mit 10 ml serum- und phenolrotfreiem DMEM gewaschen. Anschließend erfolgte die Exposition in 8 ml DMEM ohne Phenolrot unter Antibiotikazusatz. Die Kontrolle erhielt nur 8 ml DMEM ohne Phenolrot unter Zusatz von 0,2 % DMSO, wenn es sich um die Stoffe Staurosporin, Quercetin oder α -Tocopherol handelte. Während der Exposition erfolgte kein weiterer Medienaus-tausch. Beginn der Exposition war hier wieder der Zeitpunkt, zu dem die 100 mm Schalen in den Brutschrank gestellt wurden und endete mit dem Herausnehmen der Schalen aus dem Brutschrank. Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit verblieb das Versuchsmedium für 24 h auf den Zellen. Es wurde für jede zu un-tersuchende Konzentration eine 100 mm Schale, mit darin wie oben beschrieben ausgesäten und weiterbehandelten Zellen, benötigt.

Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Wirkung betrugen die Inkubationszei-ten mit Staurosporin 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, bei den Peroxiden 0 h, 2 h, 6 h, 24 h und 48 h. Zu jedem Zeitpunkt wurden gleichzeitig mehrere Konzentrationen untersucht. Für Staurosporin waren dies stets 2 Konzentrationen und eine Kontrolle. Zur Untersuchung der zeitabhängigen Wirkungen von Staurosporin wurden somit am Tag 1 insgesamt 13 Schalen angelegt. Bei den Peroxiden wurden mehr als 2 Konzentrationen pro Zeitpunkt untersucht.

2.5.2.2 Wirkung von Peroxiden auf C6-Zellen in proliferierenden Kulturen

Am Tag 1 wurden 500.000 C6-Zellen pro 100 mm Schale in serumhaltigem DMEM mit Phenolrot ausgesät. Alle weiteren Schritte erfolgten analog dem Pro-tokoll unter 2.5.2.1 mit dem Unterschied, dass durchweg FBS-haltiges DMEM ver-wendet wurde. Es wurden nur Versuche zur Konzentrationsabhängigkeit durchge-führt.

2.5.2.3 Wirkung von Antioxidantien

Aussaat und Fütterung erfolgten nach Punkt 2.5.2.1. Zur Untersuchung der Wirkung von α -Tocopherol und von Quercetin auf den Peroxid-induzierten Zelltod wurden für jeden Versuch 8 Kulturen in 100 mm Schalen angelegt. Es wurden 2 verschiedene Protokolle verwendet:

Im ersten Protokoll wurden die Auswirkungen einer zu 100 % Zelltod auslösenden Peroxidkonzentration in Anwesenheit verschiedener Antioxidantienkonzentrationen untersucht. Im zweiten Protokoll wurden die C6-Zellen mit einer zytoprotektiv wirkenden Antioxidantienkonzentration und verschiedenen Peroxidkonzentrationen inkubiert. Die Inkubationsdauer im Begasungsbrutschrank betrug in beiden Protokollen 24 h.

α -Tocopherol

Die Zellen wurden 24 h vor der Peroxidexposition mit α -Tocopherol in 10 ml FBS-haltigem Medium vorinkubiert. Durch diese Vorinkubation erfolgte am Tag 5 in allen Schalen ein weiterer Mediumaustausch. Jeweils 3 Schalen, die späteren Kontrollen, erhielten nur 10 ml frisches phenolrot- und serumhaltiges DMEM ohne α -Tocopherolzusatz. Die restlichen fünf Schalen erhielten phenolrot- und serumhaltiges DMEM mit α -Tocopherol. Am sechsten Tag erfolgte die Exposition mit dem zu untersuchenden Peroxid in 8 ml serum- und phenolrotfreiem DMEM pro Schale. Dabei wurden die oben erwähnten drei Kontrollschalen wie folgt behandelt:

Die erste Kontrollschale erhielt 8 ml serum- und phenolrotfreies DMEM. Die zweite Kontrollschale wurde mit 50 μ M α -Tocopherol in 8 ml serum- und phenolrotfreiem DMEM inkubiert. Dies ist gleichzeitig die höchste eingesetzte α -Tocopherol-Konzentration. Die dritte Kontrollschale wurde mit der höchsten eingesetzten, zytotoxisch wirkenden Peroxidkonzentration behandelt. Nach Ablauf der 24-stündigen Exposition wurden die Zellen wie unter Abschnitt 2.6.3.1 beschrieben geerntet.

Quercetin

In den Versuchen mit Quercetin wurden die Zellen nicht mit dem Antioxidans vorinkubiert. Am sechsten Kulturtag erfolgte die Exposition der C6-Zellen mit dem jeweiligen Peroxid in Gegenwart von Quercetin. Dazu wurden die Zellen wie unter

2.5.2.1 beschrieben zweimal mit phenolrotfreiem DMEM gewaschen. Anschließend erhielt jede Schale 8 ml Medium mit Antioxidans und Peroxid und wurde über 24 h im Begasungsschrank inkubiert. Die Weiterbehandlung erfolgte wie unter 2.6.3.1 beschrieben.

2.5.2.4 Wirkung einer kontinuierlichen H_2O_2 -Exposition

Um die Wirkung einer kontinuierlichen Exposition gegenüber Wasserstoffperoxid zu untersuchen, wurden die C6-Zellen in DMEM mit dem Enzym Glucoseoxidase inkubiert. Glucoseoxidase bildet Wasserstoffperoxid durch Umsatz von Glucose zu D-Glucono-1,5-Lacton (vgl. Abb. 2.1).

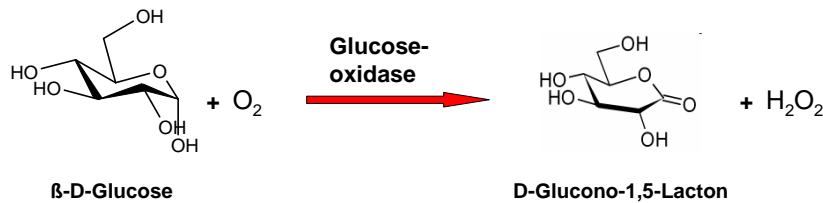


Abbildung 2.1: **Glucoseoxidase-Reaktion**

Umsetzung von Glucose zu Gluconolacton und Wasserstoffperoxid durch Glucoseoxidase (Wong et al., 2008)

Die durch Glucoseoxidase gebildeten H_2O_2 -Konzentrationen wurden in An- bzw. Abwesenheit von Zellen mit der Xylenolorangemethode bestimmt. Für diese Messung wurden Kulturen in zwei 100 mm Schalen, wie unter 2.5.2.1 beschrieben, angelegt. Am Versuchstag wurden zwei weitere 100 mm Schalen, die nur 8 ml Versuchsmedium enthielten, für eine Stunde im Begasungsbrutschrank mit 10 % CO_2 -Spannung vorgewärmt. Die Glucoseoxidase wurde in eiskaltem PBS + Ca/Mg gelöst und verdünnt. Im letzten Verdünnungsschritt wurde die Enzymlösung zum Start der Reaktion in das 37°C warme DMEM aller vier 100 mm Schalen pipettiert. Zur Bestimmung der gebildeten H_2O_2 -Konzentration durch die Glucoseoxidase wurde in den ersten 2 Stunden alle 15 Minuten aus jeder Schale 100 μl Medium entnommen, nach 2 Stunden alle

2 Material und Methoden

halbe Stunde. Das weitere Verfahren wird im Kapitel Meßmethoden näher beschrieben.

Um die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Wirkung bei kontinuierlicher Anwesenheit von H_2O_2 zu untersuchen, wurden für jeden Zeitpunkt (2 h, 4 h, 6 h, 24 h) und für jede zu untersuchende Glucoseoxidase-Konzentration eine 100 mm Schale nach 2.5.2.1 angelegt. Die Zellen jeder Schale wurde vor Beginn der Exposition zweimal mit 10 ml phenolrotfreiem DMEM gewaschen und dann wie oben beschrieben mit verschiedenen Enzymkonzentrationen inkubiert. Nach dem Ende des jeweiligen Expositionszeitraumes wurde die Zellkernmorphologie untersucht und die Caspase-3-Aktivität bestimmt.

2.6 Meßmethoden

2.6.1 Proteinbestimmung

Als Maß für die Zytotoxizität eines Peroxids wurde mit Hilfe der Methode von LOWRY et al. (1951) der Proteingehalt der nach der Exposition noch angehefteten Zellen in den Wells der 96-Well-Mikrotiterplattenkulturen bestimmt.

Prinzip:

Die Methode beruht darauf, dass Proteine zunächst im Alkalischen mit dem Cu^{2+} -Reagenz eine dem Biuret-Komplex ähnliche Verbindung eingehen. Dabei wird vermutlich Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert. Anschließend erfolgt die Reduktion des Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenz durch den Protein/Kupfer-Komplex. Dabei wird das als Heteropolysäure vorliegende Molybdat bzw. Wolramat reduziert. Es entstehen hierbei Mischoxide der Wertigkeitsstufe 6 und 4. Bei der Reduktion kommt es zu einem Farbumschlag von gelb nach blau. Die Absorption der entstehenden blauen Farbe wurde bei 630 nm im Mikrotiterplattenphotometer gemessen. Sie ist proportional zur Zellproteinmenge pro Well und wurde mittels einer Eichgeraden von Proteinstandards aus Rinderserumalbumin (BSA) bestimmt.

Lösungen:

1. PBS Puffer

2. Biuretlösung

48 Teile	Na_2CO_3 (4 %)
1 Teil	K - Na - Tartratlösung (2 %)
1 Teil	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (1 %)

3. Folinlösung

Das Folin-Ciocalteu's-Reagenz wurde 1:2 mit deionisiertem Wasser verdünnt.

4. Proteinstandards

Sechs verschiedene Proteinstandards wurden aus einer Stammlösung von Rinderserumalbumin, gelöst in 0,5 N Natriumhydroxid-Lösung, hergestellt. Die höchste

Konzentration betrug 0,4 mg BSA/ml und die niedrigste Konzentration 0,025 mg BSA/ml.

Vorbehandlung der Mikrotiterplatte:

Nach Beendigung der Exposition wurden die mit Peroxid inkubierten Zellen aus dem Brutschrank entnommen. Zur Bestimmung des Zellproteingehalts pro Well wurden alle Wells der Mikrotiterplatte dreimal mit PBS unter Zusatz von Calcium und Magnesium gespült. Die Wells mit Zellen (Spalten 3-10) erhielten jeweils 60 μ l auf 37°C vorgewärmte Natriumhydroxid-Lösung (0,5 N). Die so behandelte Platte wurde dann bei 37°C für 45 min in den Schüttelinkubator gestellt. Darauf folgend wurden in die äußeren Wells (1, 2 und 11 und 12) die Blankwerte und Proteinstandards gemäß Schema 2.2 pipettiert. Danach wurde in jedes Well 150 μ l Biuretlösung pipettiert. Zur besseren Durchmischung der Lösungen wurde die Platte für weitere 10 Minuten bei 37°C in den Schüttelinkubator gestellt. Im letzten Schritt wurde jedes Well mit 60 μ l Folinlösung beschickt und für 20 min bei 37°C auf dem Schüttelinkubator gemischt. Im Anschluß wurde die Extinktion der gebildeten blauen Farbe im Mikrotiterplattenphotometer (BIO-Tek ELx 800 UV) bei 630 nm gemessen.

Auswertung

Die zytotoxische Wirkung eines Peroxids ergibt sich aus der Abnahme des Zellproteingehalts pro Well verglichen mit den unbehandelten Kontrollen.

Über die Blindwert bereinigte Eichgerade wurde der Proteingehalt der nach Peroxidexposition in den Wells noch angehefteten Zellen in μ g pro Well ermittelt. Jede Mikrotiterplatte enthielt insgesamt 12 Kontrollwells mit unbehandelten Zellen (vgl. Abb.2.2). Der Mittelwert des Proteingehalts in den Kontrollwells wurde mit 100 % gleichgesetzt. Der Proteingehalt der Testgruppen, die mit einer bestimmten Peroxidkonzentration behandelt wurden, ist jeweils der Mittelwert aus 6 Probenwells und wurde in % zur Kontrolle ausgedrückt.

Mit diesen Werten wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt. Aus ihnen konnte der EC₅₀-Wert ermittelt werden, welcher derjenigen Konzentration des Peroxids entspricht, die eine Reduktion des Proteingehalts (und damit der angehefteten Zellen) um 50 % hervorruft.

2 Material und Methoden

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	BLK	ST03									ST03	BLK	A
B	BLK	ST03	K	P1	P2	P3	K	P4	P5	P6	ST03	BLK	B
C	BLK	ST04	K	P1	P2	P3	K	P4	P5	P6	ST04	BLK	C
D	BLK	ST04	K	P1	P2	P3	K	P4	P5	P6	ST04	BLK	D
E	ST01	ST05	K	P1	P2	P3	K	P4	P5	P6	ST05	ST01	E
F	ST01	ST05	K	P1	P2	P3	K	P4	P5	P6	ST05	ST01	F
G	ST02	ST06	K	P1	P2	P3	K	P4	P5	P6	ST06	ST02	G
H	ST02	ST06									ST06	ST02	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abbildung 2.2: **Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Proteinbestimmung**

Gezeigt ist die Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Bestimmung der Zellproteinmenge noch angehefteter Zellen pro Well
Blank (BLK), Kontrolle (K), Wells mit zu testender Substanz (P)

2.6.2 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies

Zur Messung der intrazellulären Radikalbildung wurde eine auf der Oxidation des H₂-DCF zum fluoreszierenden DCF basierende Methode nach Wang und Joseph, 1999 und Rüweler et al., 2008) verwendet.

Prinzip:

Das Diacetat des 2',7'-Dichlordihydrofluoresceins wird im Gegensatz zum 2',7'-Dichlordihydrofluorescein (H₂-DCF) schnell von den Zellen aufgenommen und akkumuliert im Zytosol. Dort wird das 2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat (H₂-DCF-DA) von intrazellulären Esterasen deacetyliert. Reaktive Sauerstoffspezies wie z.B. das Hydroxylradikal (OH•) oder Alkoxyradikale können nun das nicht fluoreszierende H₂-DCF zum fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF) oxidieren. Die emittierte Fluoreszenz ist proportional zur Konzentration an freien Radikalen und kann, wenn das

2 Material und Methoden

DCF-Molekül bei 488 nm angeregt wird, bei einer Emissionswellenlänge von 525 nm detektiert werden (Halliwell und Whiteman, 2004). Mit dieser Methode lassen sich Peroxide nur nachweisen, wenn sie zuvor zu Radikalen umgewandelt worden sind. So wird $\text{H}_2\text{-DCF}$ durch H_2O_2 nur sehr langsam oxidiert, wohl aber sehr effizient in Gegenwart von Eisen (LeBel et al., 1992). $\text{H}_2\text{-DCF}$ reagiert nicht spezifisch mit einem bestimmten Radikal, sondern mehr oder weniger mit allen in der Zelle entstehenden Radikalen. Die Höhe des Fluoreszenzsignals ist daher als Maß für den allgemeinen oxidativen Stress zu interpretieren (Halliwell und Whiteman, 2004).

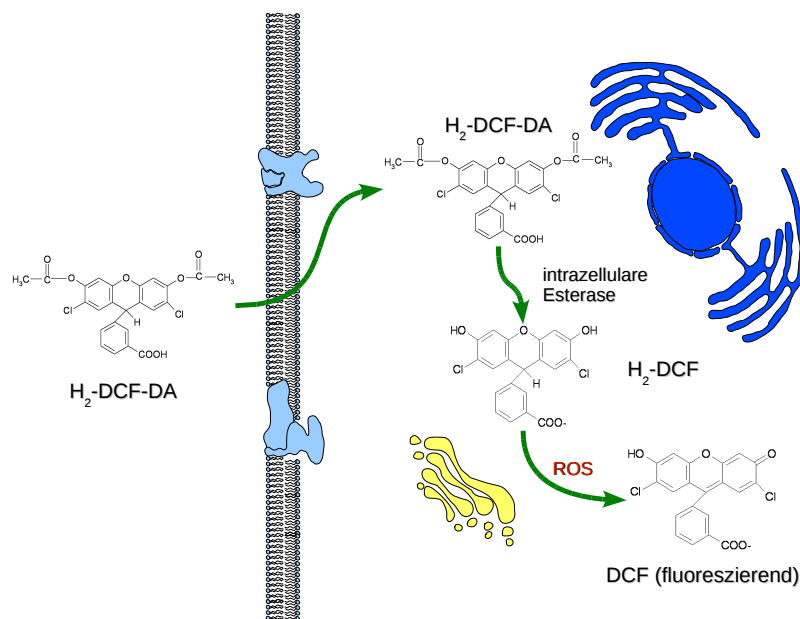


Abbildung 2.3: **Umwandlungsschema des $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ zum fluoreszierenden DCF**

Das 2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat wird in die Zelle aufgenommen und dort von intrazellulären Esterasen hydrolysiert. Das nicht fluoreszierende Dichlordihydrofluorescein ($\text{H}_2\text{-DCF}$) wird durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zum fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert (Halliwell et al., 2004).

Behandlung der Mikrotiterplatte:

Am Versuchstag wurde die Platte zweimal mit 150 μ l HanksBSS gespült. Dieser Spülschritt dient der vollständigen Entfernung des Serums, da dieses Esterasen enthalten kann, die H₂-DCF-DA hydrolysieren können (Halliwell und Whiteman, 2004). Anschließend wurde jedes Well mit Zellen mit 150 μ l einer auf 37°C erwärmten, 10 μ molaren H₂-DCF-DA Lösung für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Dies dient dem Aufladen der Zellen. Danach wurden die Wells wieder zweimal mit 150 μ l HBSS gespült, um nicht umgesetztes H₂-DCF-DA zu entfernen. Darauf folgend wurde in jedes Well mit Zellen je 150 μ l der jeweiligen Peroxidlösung gegeben. Die emittierte Fluoreszenz wurde über 120 Minuten im Fluorimeter gemessen.

Einstellungen am Fluorimeter:

Measurement mode	Fluorescence Intensity, Kinetic
Plate definition file	GRE96fb.pdf
Part of the plate	Pattern: Square Number of reads: 3x3
Fluorescence wavelengths	Excitation: 485nm Emission: 535 nm
Gain	Manual(40)
Mirror selection	Automatic
Lag time	0 μ s
Integration time	40 μ s
Kinetic	7 cycles
Temperature valid range	37°C

Das Fluorimeter wurde vor der Messung auf 37°C vorgewärmt.

Belegung der 96-Well-Platte:

Die äußeren Wells dienten als Blindwerte. Sie enthielten 150 μ l HBSS. Die Wells der Kontrollgruppe enthielten Zellen in HBSS, welche mit H₂-DCF-DA aufgeladen worden sind. Die Wells P1-P8 enthielten die mit H₂-DCF-DA beladenen Zellen und

2 Material und Methoden

die jeweilige Konzentration des zu testenden Peroxids (siehe Abb. 2.4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	BLK											BLK	A
B	BLK	K	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	K	BLK	B
C	BLK	K	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	K	BLK	C
D	BLK	K	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	K	BLK	D
E	BLK	K	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	K	BLK	E
F	BLK	K	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	K	BLK	F
G	BLK	K	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	K	BLK	G
H	BLK											BLK	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abbildung 2.4: **Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies**

Blank (BLK)

Kontrolle (K)

Gruppen mit zu testendem Peroxid (P1-P8)

Auswertung:

Die Höhe des Fluoreszenzsignals ist ein Maß für den oxidativen Stress durch intrazelluläre Radikalbildung und wird in Fluoreszenzunits angegeben.

Der Wert der Kontrolle ist der um den Blankwert bereinigte Mittelwert aus 12 Kontrollwells. Der um den Blankwert bereinigte Mittelwert der jeweiligen Testgruppe wird aus 6 Wells pro Peroxidkonzentration gebildet. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals wurde für jede Peroxidkonzentration über die Messzeit von 120 Minuten aufgetragen.

2.6.3 Quantifizierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen

2.6.3.1 Ernten und Aufbereiten der Zellen

Nach dem Ende der Exposition wurden die Zellen mitsamt dem Expositionsmedium in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit dem Ziel alle Zellen, d.h. sowohl die angehefteten als auch die bereits abgelösten Zellen miteinander zu vereinigen. Dazu wurden zunächst die 8 ml Expositionsmedium ins Röhrchen überführt. Die noch angehefteten Zellen wurden durch Trypsinisieren vom Boden abgelöst. Jede Probe wurde mit 6 ml auf 37°C erwärmter Trypsinlösung (Verd. 1:6) für 90 Sekunden behandelt. Anschließend wurde das Trypsin mit 6 ml FBS-haltigem Medium (5 %) inaktiviert. Die sich nun leicht vom Boden lösenden Zellen wurden mit phenolrotfreiem DMEM vom Schalenboden abgespült und im Röhrchen gesammelt. Schließlich wurden die Proben mit Medium auf 50 ml aufgefüllt. Die mit organischen Peroxiden behandelten Zellen wurden nicht trypsinisiert, wenn sie durch die Behandlung bereits so stark geschädigt waren, dass sie sich durch dreimaliges Spülen mit DMEM vom Schalenboden lösten. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass das Trypsinisieren die vollständige Sedimentation beim Zentrifugieren und das sich anschließende Resuspendieren des Zellpelletts in HBSS der mit organischen Peroxiden behandelten Zellen verhindert. Der Einfluss des jeweiligen Ernteverfahrens auf die prozentualen Anteile apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen in den Kontrollen wird in Abschnitt 3.1 dargestellt.

Nach dem Ernten wurden die Zellen bei 3000 RPM ($1560 \times g$) für 15 Minuten bei 5°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet in 700 μ l HBSS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für die nachfolgenden Bestimmungen aufgeteilt:

1. 2 x 25 μ l zur Proteinbestimmung
2. 500 μ l zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität
3. 100 μ l zur Bestimmung der Kernmorphologie

Die Proben für die Proteinbestimmung wurden mit 0,5 N NaOH auf 1200 μ l aufge-

füllt und bei -20°C gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte analog der unter 2.6.1 beschriebenen Methode nach Lowry. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Das 500 µl Aliquot für die Caspase-3-Bestimmung wurde in der Zentrifuge (Heraeus fresco 21) mit 5000 RPM ($2,4 \times g$) bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde wieder bei gleicher Drehzahl und Temperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Der PBS-Puffer wurde restlos entfernt. Nun erfolgte die Zugabe des ebenfalls eiskalten Lysispuffers. Mittels einer 100 µl Pipette wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren im Lysispuffer vereinzelt, dann für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellbruchstücke durch Zentrifugation aus dem Lysat entfernt ($16.000 \times g$; 4°C; 15 Minuten) und 220 µl des Lysates in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bis zur Aktivitätsbestimmung der Caspase-3 bei -70°C.

2.6.3.2 Untersuchung der Zellkernmorphologie

Zur Quantifizierung apoptotischer und nekrotischer Zellen wurden die C6-Zellen mit zwei fluoreszierenden Kernfarbstoffen, Hoechst 33342 und Propidiumjodid, angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) wurden mit Hilfe einer Digitalkamera (Canon Powershot A620) zufällig gewählte Bereiche durch Abfahren des Objektträgers fotografiert. Anhand der digitalisierten Bilder wurden die Zellkerne ausgezählt und eingeteilt nach Kernen lebender, nekrotischer, apoptotischer und spätapoptotischer Zellen.

Prinzip der Färbung:

Hoechst 33342 durchwandert als lipophiler Farbstoff die Zellmembran intakter Zellen und bindet vornehmlich an AT-reiche DNA-Regionen im Kern (Latt und Stetten, 1976). Hoechst 33342 hat ein Anregungsmaximum bei 350 nm und ein Emissionsmaximum bei 460 nm. Der Zellkern intakter Zellen erscheint dadurch in einem hellen Blau.

Propidiumjodid als ionisch aufgebauter Farbstoff durchdringt nur die Zellmembran von toten Zellen und bindet mit geringer bis keiner Sequenzpräferenz in einem stöchiometrischen Verhältnis von einem Farbstoffmolekül zu 4-5 Basenpaaren an die

2 Material und Methoden

DNA (Waring, 1965). Das Anregungsmaximum von Propidiumjodid liegt bei 530 nm, das Emissionsmaximum bei 630 nm. Die Kerne toter Zellen erscheinen daher in einem hellen Rot. Propidiumjodid bindet auch an die RNA. RNA-reiche Regionen im Zytoplasma sind daher dunkelrot gefärbt. Tote und lebende, aber nicht apoptotische Zellen zeichnen sich durch eine Struktur in ihrem Zellkern aus, welche durch die Verteilung des Chromatins zustande kommt. Diese kann sich je nach Zelltyp unterscheiden. Nekrotische Kerne sind im Vergleich zu Kernen lebender Zellen oft vergrößert.

Die Kerne noch lebender, aber apoptotischer Zellen, deren Zellmembran intakt ist, zeichnen sich durch ein stark verdichtetes Chromatin aus, welches gleichmäßig blau strahlt. Das Chromatin kann dabei in Form von Halbmonden am Zellkernrand angelagert sein oder als Gruppe kleiner hellleuchtender Kugeln erscheinen. Die Kerne apoptotischer Zellen sind oft kleiner als die von lebenden Zellen. Sie werden im Folgenden als apoptotisch oder frühapoptotisch bezeichnet (Duke, 2004).

Demgegenüber stehen die Kerne bereits toter, aber per Apoptose untergegangener Zellen. Die Zellmembran dieser Zellen ist bereits soweit zerstört, dass sie für Propidiumjodid durchlässig geworden ist.

Den Übergang eines apoptotischen zu einem spätapoptotischen Kern zeigt die Bilderserie in Abb. 2.6. Das Chromatin dieser Zellen leuchtet durch das Eindringen des Propidiumjodids in die Zelle hellrot, ist zudem stark verdichtet und oft in mehrere Fragmente zerfallen (Duke, 2004). Abbildung 2.5 zeigt die verschiedenen Zellkerntypen nach Anfärbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen.

Methode zur Anfärbung:

Die Anfärbung der Kerne erfolgte im Wesentlichen nach einem Protokoll von Duke (2004).

Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden als Pulver von der Firma Sigma bezogen. Sie wurden in Wasser zu einer Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Die Stammlösung wurde in 100 μ l Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Für jeden Versuch wurde ein neues Aliquot verwendet. Aus den Stammlösungen wurden für die Versuche Verdünnungen in HBSS hergestellt. In HBSS fällt der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 im Gegensatz zu PBS oder DMEM nicht aus.

2 Material und Methoden

Jeweils 10 μl der verdünnten Farbstofflösungen Hoechst 33342 und Propidiumjodid wurden mit (100 μl) der unter 2.6.3.1 hergestellten Zellsuspension auf dem Vortex gemischt. Die Endkonzentration in der Zellsuspension betrug für Hoechst 33342 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und für Propidiumjodid 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Anfärbungszeit betrug 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden zweimal 10 μl von der Zellsuspension auf einen Objektträger aufgetragen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden in Filterstellung 1 (Filterset: G 365, FT 395; LP 420) mindestens 10 zufällig ausgewählte Bildabschnitte fotografiert. Als Lichtquelle für die Anregungswellenlängen wurde eine Quecksilberdampf Lampe verwendet. Fotografiert wurde im AV-Modus (aperture value). In diesem Modus wurde die Belichtungszeit automatisch von der Kamera vorgegeben.

Auswertung:

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie können 4 verschiedene morphologische Zustände der Zellkerne differenziert werden (s. Abb. 2.5):

1. Kerne lebender Zellen
2. Kerne nekrotischer Zellen
3. Kerne apoptotischer Zellen
4. Kerne spätapoptotischer Zellen

Im Gegensatz hierzu werden Zellen, die bereits soweit zerstört sind, dass sie sich im ersten Zentrifugationsschritt nach der Exposition und dem Ernten nicht sedimentieren lassen, als „desintegrierte Zellen“ bezeichnet. Der prozentuale Anteil der desintegrierten Zellen wurde folglich nicht durch die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfasst, sondern errechnete sich aus dem Unterschied des Proteingehalts der Probe und der zugehörigen Kontrolle in Prozent. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse erhielt man zunächst die Anteile lebender, nekrotischer und apoptotischer Zellen in % zur Gesamtzahl ausgezählter Zellen („analysierter Zellen“). Die nach dem Auszählen erhaltenen Prozentsätze wurden unter Berücksichtigung des Anteils desintegrierter Zellen auf die Gesamtpopulation aller in einer Kulturschale vorhandenen Zellen bezogen.

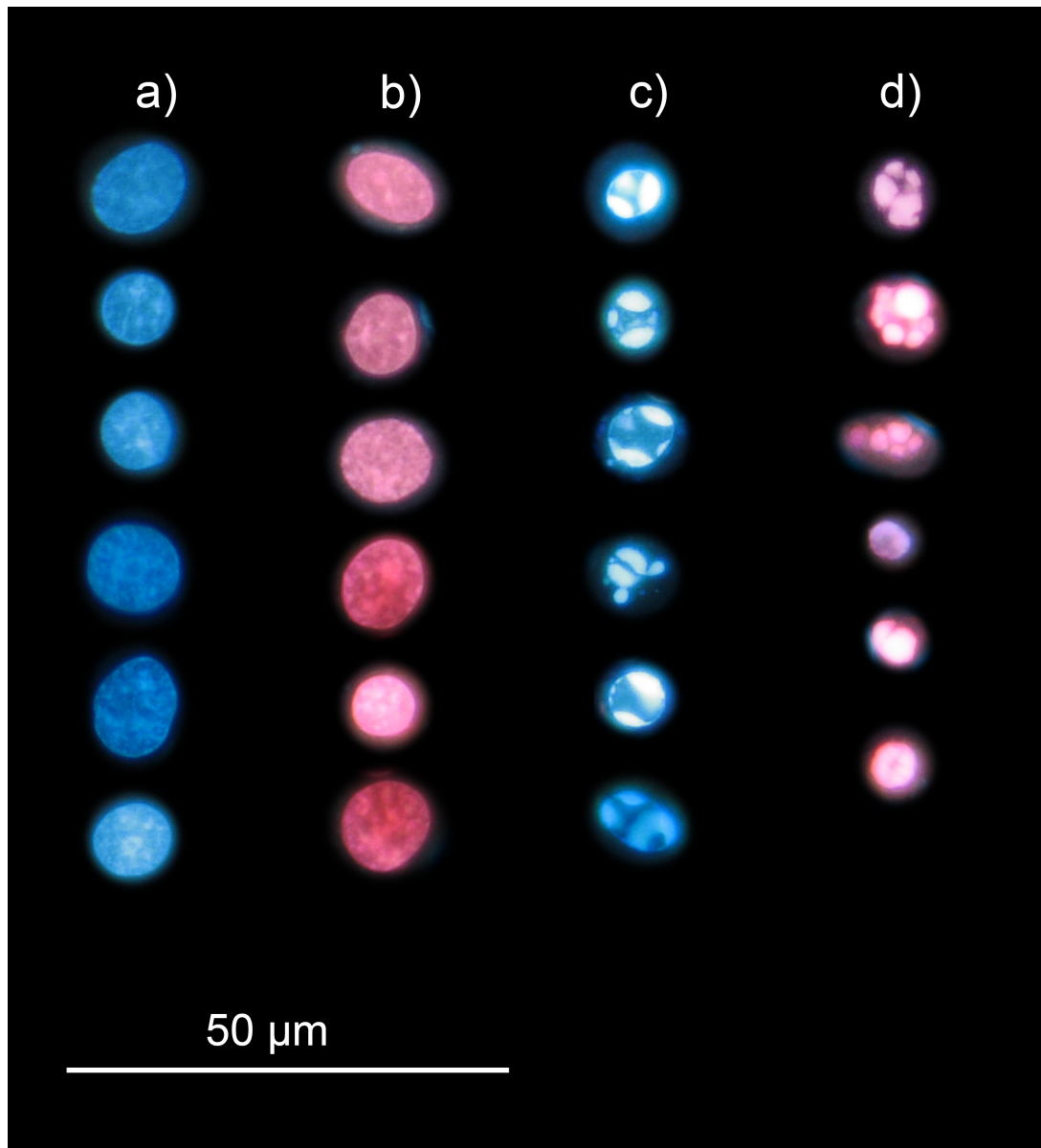


Abbildung 2.5: **Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von C6-Zellkernen nach Anfärbung mit Hoechst 33342 und Propidiumjodid**

- a) Kerne lebender C6-Zellen
- b) Kerne nekrotischer C6-Zellen
- c) Kerne apoptotischer C6-Zellen
- d) Kerne spätapoptotischer C6-Zellen

Die Apoptose wurde in den C6-Zellen durch Inkubation mit Staurosporin ($1 \mu\text{g/ml}$) induziert. Die Aufnahmen erfolgten nach 24-stündiger Exposition bei 400 facher Vergrößerung (Zeiss Fluoreszenzmikroskop, Kamera Canon Powershot A620).

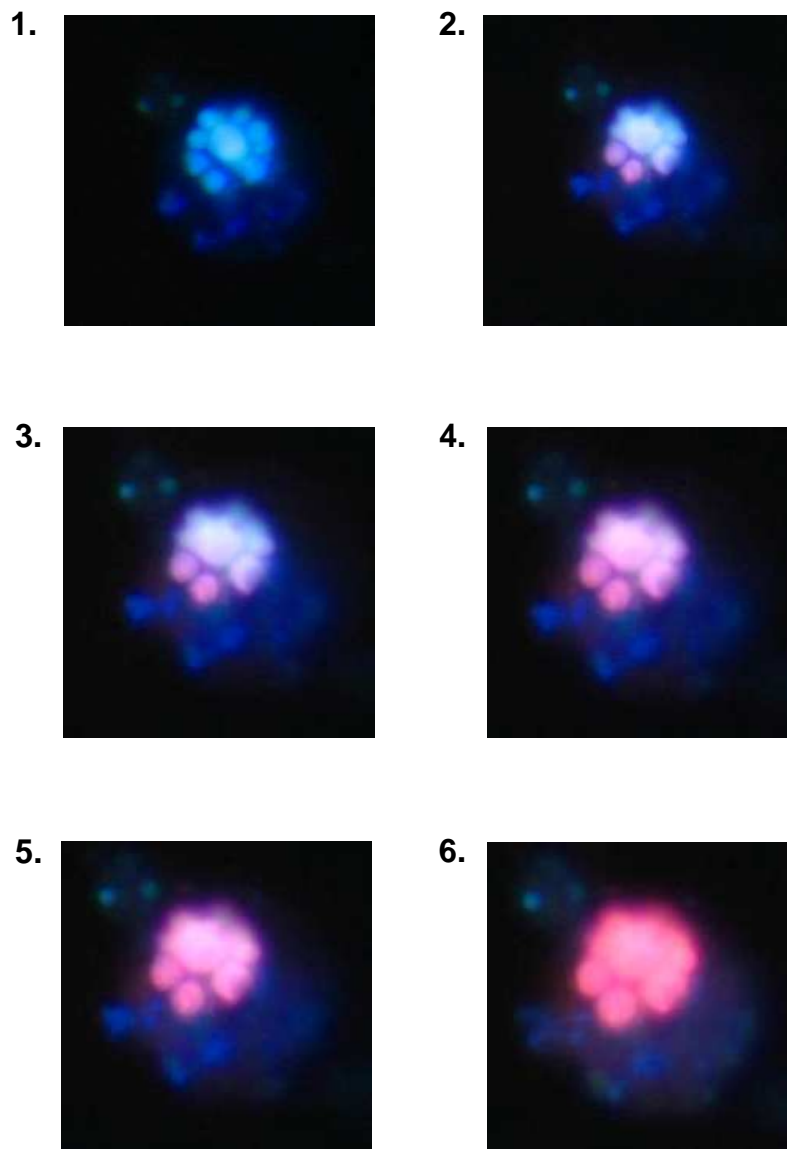


Abbildung 2.6: **Übergang eines apoptotischen zu einem spätapoptotischen Zellkern**

Gezeigt ist ein einzelner apoptotischer Zellkern einer C6-Zelle. Die Aufnahme erfolgte nach 24-stündiger Exposition von C6-Zellen mit Staurosporin ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$). Die Bilderserie 1-6 zeigt wie Propidiumjodid, welches die bereits zerstörte Zellmembran durchdrungen hat, das hellleuchtende, kondensierte Chromatin des apoptotischen Zellkerns hellrot färbt. Der Zeitraum zwischen den Aufnahmen 1 bis 6 betrug 2 Minuten (Zeiss Fluoreszenzmikroskop, Kamera Canon Powershot A620)

2.6.3.3 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität

Die Aktivität der Caspase-3 und anderer Caspasen, die eine Substratspezifität für das Peptidsubstrat DEVD zeigen, wurden mit Hilfe des kolorimetrischen Caspase-3-Assay Kits (Sigma) bestimmt.

Das Prinzip der Caspase-3-Messung basiert auf der Messung einer Absorptionzunahme des bei der hydrolytischen Spaltung des synthetischen Caspasesubstrats (Ac-DEVD-p-NA) freiwerdenden p-Nitroanilin (p-NA) durch aktivierte Caspase-3. Das p-NA hat ein Absorptionsmaximum bei 405 nm. Bei dieser Wellenlänge wurde die Konzentration des p-NA mit Hilfe einer Eichgerade von definierten p-NA Standards bestimmt.

Kitaufbereitung:

Der Caspas-3 Assay Kit von Sigma enthält folgende Bestandteile:

1. Assaypuffer (200 mM Hepes(pH 7,4), 20 mM EDTA, 0,1 % Chaps, 50 mM DTT)
2. Substrat (Ac-DEVD-pNA)
3. Caspase-3 Positivkontrolle
4. Caspase-3-Inhibitor (Ac-DEVD-CHO)
5. Lysispuffer (250 mM Hepes (pH 7,4), 50 mM Chaps, 50 mM DTT)

Der Assaypuffer ist zehnfach konzentriert, der Lysispuffer fünffach. Beide Puffer wurden in kleinen Portionen in Reaktionsgefäße (1,5 ml) umgefüllt und anschließend mit Stickstoff begast, da der Assaypuffer und der Lysispuffer Dithiothreitol (DTT) enthalten, welches an der Luft relativ instabil ist. DTT soll die Oxidation der Sulfhydrylgruppen in den Cysteinresten im aktiven Zentrum der Caspasen zu Disulfidbrücken verhindern (Köhler et al., 2002). Ist das DTT selbst oxidiert oder ist der pH-Wert unterhalb von pH 7, können die reduzierenden Bedingungen im Assay nicht aufrechterhalten werden und die Substratumsätze sinken. Zu Beginn einer jeden Caspase-3-Aktivitätsbestimmung wurde eine entsprechende Menge Puffer in Reinstwasser (17 Megohm) verdünnt.

Substrat:

Das Substrat wurde in DMSO gelöst und in kleinen Portionen zu je 100 μ l abgefüllt und bei -20°C gelagert. Für die Bestimmung wurde die Stammlösung (20 mM) auf 2 mM mit Assaypuffer verdünnt.

Inhibitor:

Mit dem Inhibitor wurde in ähnlicher Weise verfahren wie mit dem Substrat. Vor Beginn der Bestimmung wurde eine entsprechende Menge der Inhibitor-Stammlösung (2 mM) auf 200 μ M mit Assaypuffer verdünnt.

Caspase-3 Positivkontrolle:

Das Pulver der Caspase-3 wurde in deionisiertem Wasser (17 Megohm) gelöst und in Portionen zu je 1,5 μ l bei -70°C gelagert. Direkt vor der Bestimmung wurde die Caspasepositivkontrolle (100 μ g/ml) mit Assaypuffer, der zusätzlich 1 mg/ml BSA 8022 enthielt, auf 5 μ g/ml verdünnt.

Bestimmung:

Die Caspase-3-Aktivität wurde in 96-Well-Mikrotiterplatten (Sarstedt) bestimmt. Dafür wurden zunächst die p-NA-Standards für die Eichgerade aus einer in DMSO gelösten p-NA-Stammlösung mit Assaypuffer hergestellt. Als niedrigster p-NA-Standard wurde 10 μ M, als höchster 200 μ M verwendet. Das Gesamtvolumen in den Wells betrug 100 μ l. Um zu überprüfen, ob freigesetztes p-NA aufgrund der Spaltung des Substrats durch Caspase-3-like-Proteasen entstanden ist und nicht durch andere Proteasen oder durch unspezifische Hydrolyse, gab es für jede Probe zusätzliche Kontrollwells, welche die zu bestimmende Probe mit Inhibitor enthielten. Der in diesem Kit verwendete Inhibitor trug zusätzlich zu der Tetrapeptidsequenz DEVD eine Aldehydgruppe, wodurch er reversibel an das aktive Zentrum der Caspase binden konnte. Das Gesamtvolumen von 100 μ l in den Wells setzte sich wie folgt zusammen und wurde in folgender Reihenfolge pipettiert:

1. Zelllysat 40 μ l
2. Assaypuffer 50 μ l, bei Zusatz von Inhibitor 40 μ l
3. Inhibitor 10 μ l
4. Substrat 10 μ l

2 Material und Methoden

Durch die Zugabe von Substrat wurde die Reaktion gestartet. Zur Überprüfung der optimalen Assaybedingungen diente die Caspasepositivkontrolle. Die Wells der Caspasepositivkontrolle enthielten folgende Komponenten:

1. 5 μ l Caspase
2. 85 μ l Assaypuffer bzw. bei Inhibitorzusatz 75 μ l
3. 10 μ l Inhibitor
4. 10 μ l Substrat

Die Belegung der Platte erfolgte nach dem in Abbildung 2.7 gezeigten Schema. Nach der Substratzugabe wurde die Mikrotiterplatte für 5 Minuten bei 37°C auf den Schüttelinkubator gemischt und danach für 3 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Absorption des bei der Reaktion entstandenen p-NA bei 405 nm gemessen. Über die Blindwert bereinigte Eichgerade konnte dann die Caspaseaktivität in nmol p-NA pro mg Protein und 3 h bestimmt werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	BLK	ST04	P1	P1+I	P5	P5+I	P09	P9+I	P13	P13+I			A
B	BLK	ST04	P1	P1+I	P5	P5+I	P09	P9+I	P13	P13+I			B
C	ST01	ST05	P2	P2+I	P6	P6+I	P10	P10+I	P14	P14+I			C
D	ST01	ST05	P2	P2+I	P6	P6+I	P10	P10+I	P14	P14+I			D
E	ST02	C-3-Pos.	P3	P3+I	P7	P7+I	P11	P11+I	P15	P15+I			E
F	ST02	C-3-Pos.	P3	P3+I	P7	P7+I	P11	P11+I	P15	P15+I			F
G	ST03	C-3-Pos.+I	P4	P04+I	P8	P8+I	P12	P12+I	P16	P16+I			G
H	ST03	C-3-Pos.+I	P4	P04+I	P8	P8+I	P12	P12+I	P16	P16+I			H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abbildung 2.7: **Belegung einer Mikrotiterplatte zur Bestimmung Caspase-3-Aktivität**

Blank (BLK), Standard (ST), Wells mit Zelllysate (P)

Wells mit Zelllysate und Inhibitor (P+I)

Caspasepositivkontrolle (C-3-Pos.)

Caspasepositivkontrolle und Inhibitor (C-3-Pos.+I)

2.6.4 Bestimmung von H_2O_2

Die Konzentration des durch das Enzym Glucoseoxidase gebildeten Wasserstoffperoxids wurde mit Hilfe der Xylenol-Orange-Methode bestimmt. Es handelt sich hierbei um eine von Jiang et al. (1990) entwickelte Methode, mit der die Konzentration von Peroxiden photometrisch im Medium bestimmt werden kann. Dringen et al. (1998) modifizierten diese Methode für Mikrotiterplatten. Die Wirkung des kontinuierlich gebildeten Wasserstoffperoxids auf C6-Zellen wurde mit den unter 2.6.3 beschriebenen Methoden untersucht.

Materialien und Lösungen:

1. H_2SO_4 (25 mM)
2. Reaktionslösung: D-Sorbit-Lsg. (200 mM); Xylenol-Orange-Lsg. (200 μM); Diammoniumeisen-2-sulfat-Hexahydrat-Lsg. (200 μM)
3. PBS-Puffer mit Ca/Mg
4. Mikrotiterplatten
5. 100 mm Schalen
6. Mikrotiterplattenphotometer (Filter 570 nm)

Das Prinzip der Xylenol-Orange-Methode beruht auf der Oxidation des im Diammoniumeisen-2-sulfat-Hexahydrat vorliegenden Fe^{2+} zu Fe^{3+} durch Peroxide. Die Reaktion findet im sauren Milieu statt und wird durch Sorbitol katalysiert. Das gebildete Fe^{3+} bildet zusammen mit dem Xylenol-Orange einen farbigen Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei 540 - 560 nm liegt. Die Absorption des Komplexes verhält sich im Bereich von 0 - 250 μM proportional zur Wasserstoffperoxid-Konzentration und wurde mit Hilfe einer Eichgeraden aus H_2O_2 -Standards bestimmt. Die durch Glucoseoxidase gebildeten H_2O_2 -Konzentrationen im Medium wurden in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von C6-Zellen gemessen.

2 Material und Methoden

Messung:

In die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 140 μl H_2SO_4 (25 mM) gegeben. Alle 15 Minuten wurden dreimal 10 μl Probe aus der 100 mm Schale entnommen und in drei aufeinanderfolgende Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Der gesamte Messzeitraum betrug 6 h. In den ersten 2 h erfolgte die Entnahme der Proben alle 15, danach alle 30 Minuten. Vor jeder Probenentnahme wurde die 100 mm Schale zur besseren Durchmischung leicht hin- und hergeschwenkt. Lag die erwartete H_2O_2 -Konzentration über 200 μM und damit außerhalb des linearen Bereichs der Eichgeraden, wurde die Probe mit DMEM verdünnt. Dazu wurde eine entsprechende Menge DMEM in einem Reaktionsgefäß 2 ml vorgelegt und bis zur Verdünnung im 37°C warmen Brutschrank inkubiert. Eine Stunde vor Messende wurden die H_2O_2 -Standards in den Konzentrationen 6; 12,5; 25; 50; 100 und 200 μM in phenolrotfreiem DMEM angesetzt. Nach dem Pipettieren der Standards gemäß Schema 2.8 erfolgte die Zugabe von 150 μl Reaktionslösung in jedes Well. Danach wurde die 96-Well-Platte für 45 Minuten auf dem Schüttelinkubator bei Raumtemperatur geschüttelt. Abschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 570 nm im Mikrotiterplattenphotometer Biotek ELX800.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	BLK	ST03	P01	P03	P05	P07	P09	P11	P13	P15	ST03	BLK	A
B	BLK	ST03	P01	P03	P05	P07	P09	P11	P13	P15	ST03	BLK	B
C	BLK	ST04	P01	P03	P05	P07	P09	P11	P13	P15	ST04	BLK	C
D	BLK	ST04									ST04	BLK	D
E	ST01	ST05									ST05	ST01	E
F	ST01	ST05	P02	P04	P06	P08	P10	P12	P14	P16	ST05	ST01	F
G	ST02	ST06	P02	P04	P06	P08	P10	P12	P14	P16	ST06	ST02	G
H	ST02	ST06	P02	P04	P06	P08	P10	P12	P14	P16	ST06	ST02	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abbildung 2.8: Belegung einer Mikrotiterplatte zur Bestimmung von H_2O_2
Blank (BLK), Standard (STD), Probe (P)

2 Material und Methoden

Auswertung:

Mit Hilfe der Eichgeraden aus H_2O_2 -Standards wurde aus den Absorptionswerten der Proben die entsprechende H_2O_2 -Konzentration ermittelt. Der blankbereinigte Mittelwert aus jeweils 3 Probenwells stellte die gemessene H_2O_2 -Konzentration im Medium zu den entsprechenden Zeitpunkten dar. Die sich aus den Mittelwerten ergebenden H_2O_2 -Konzentrationen wurden gegen die Messzeit aufgetragen. Aus der Steigung der Geraden der im zellfreiem Medium gemessenen Werte ergab sich die Bildungsrate von H_2O_2 in $\mu\text{M}/\text{min}$. Jede Messung wurde in 3 voneinander unabhängigen Versuchen wiederholt.

2.7 Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software Graph Pad Prism 4. Grundsätzlich wurden die Experimente mindestens dreimal wiederholt. Wenn nicht anders angegeben, entsprechen die Ergebnisse dem Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean = SEM). Die Fehlerbalken sind nicht dargestellt, wenn diese kleiner sind als die Symbole, die den Mittelwert repräsentieren. Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mittels der Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Tukey Test durchgeführt. Ein Unterschied wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Einflüsse des Ernteverfahrens

Wie sich in Vorversuchen gezeigt hatte, konnten Zellen, die durch die Behandlung mit hohen Konzentrationen organischer Peroxide (CHP und tert.-BuOOH) stark geschädigt wurden, nicht durch Trypsinisieren aus den 100 mm Schalen geerntet werden. In diesen Fällen ließen sich die Zellen nach dem Trypsinisieren nicht vollständig herunter zentrifugieren. Weiterhin konnte das nach der Zentrifugation erhaltene Zellpellet nicht in HBSS resuspendiert werden, weil die Zellen stark verklebt waren (siehe Abschnitt 2.6.3.1). Daher wurde zum Ernten der Kulturen, die durch Behandlung mit organischen Peroxiden stark geschädigt wurden, kein Trypsin zum Ernten verwendet. Die Zellen ließen sich bereits durch Abspülen mit DMEM vom Schalenboden lösen. Dagegen erhöhte sich der prozentuale Anteil nekrotischer Zellen in den unbehandelten Kontrollen (vgl. Abb. 3.1), wenn diese ohne Trypsin geerntet wurden. In den Kontrollen ist die Haftung der Zellen am Schalenboden sehr gut. Daher sind diese Zellen durch alleiniges Abspülen mit DMEM im Gegensatz zu bereits mit Peroxid geschädigten Zellen nur schwer vom Boden zu lösen. Abbildung 3.1 veranschaulicht den Einfluss des Ernteverfahrens auf die prozentualen Anteile nekrotischer und apoptotischer Zellen in den Kontrollen. Durch die erhöhte mechanische Belastung während des Abspülens ist der Nekroseanteil signifikant erhöht. Weiterhin sind die prozentualen Anteile nekrotischer Zellen in den Kontrollen durch das Ernten ohne Trypsin stärker gestreut als durch das Ernteverfahren mit Trypsin. Der Anteil apoptotischer Zellen in den Kontrollen verändert sich hingegen in Abhängigkeit vom angewendeten Ernteverfahren nicht (siehe Abb. 3.1). Das Ernten der Kontrollen mit Trypsin wäre somit das schonendere Verfahren im Hinblick auf die prozentualen Anteile nekrotischer Zellen und darüber hinaus aufgrund der geringeren Streuung auch

3 Ergebnisse

das stabilere Verfahren. Diese Erkenntnisse führten zu dem unter 2.6.3.1 beschriebenen Ernteverfahren. Durch organische Peroxide stark geschädigte Zellen wurden nicht noch zusätzlich trypsinisiert, wenn sie sich durch dreimaliges Spülen vom Schalenboden lösten. Wohingegen die zugehörigen Kontrollen zur Vermeidung zu hoher Nekroseraten mit Trypsin geerntet wurden.

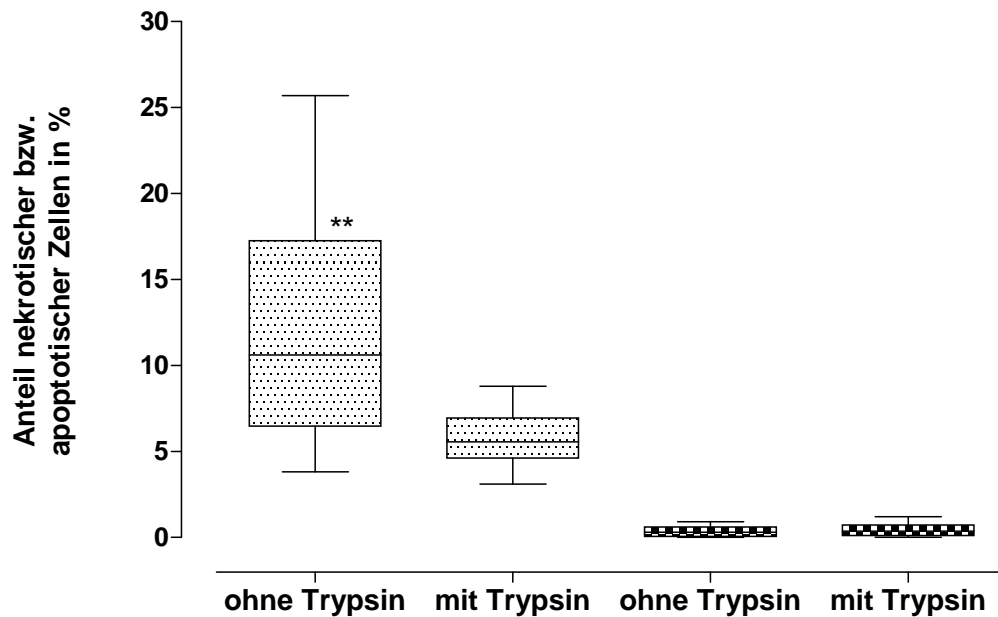


Abbildung 3.1: **Einfluss des Ernteverfahrens auf die Nekrose- bzw. Apoptoseraten in den Kontrollen**

Gezeigt sind die Anteile nekrotischer (gepunktet) bzw. apoptotischer (kariert) Zellen in den Kontrollen in Abhängigkeit vom angewendeten Ernteverfahren. Die Zellen wurden entweder mit Hilfe von Trypsin geerntet oder durch Abspülen mit phenolrotfreiem DMEM vom Schalenboden der 100 mm Schale gelöst. In einem Box-and-whiskers-plot sind die Werte aus 55 Versuchen mit Minimum, Maximum, Median und 25 % bzw. 75 % Perzentil dargestellt. Die prozentualen Anteile nekrotischer Zellen sind beim Ernteverfahren mit Trypsin signifikant erhöht im Vergleich zum Ernteverfahren ohne Trypsin ($P < 0,0001$). Es besteht kein Unterschied in den Anteilen apoptotischer Zellen.

3.2 Auslösung des Zelltods durch Staurosporin

Zur Etablierung der Nachweismethoden für den apoptotischen und nekrotischen Zelltod und des Versuchsaufbaus wurde Staurosporin als Testsubstanz verwendet. Staurosporin gilt als klassischer Apoptoseauslöser und ist in der Lage in einer Vielzahl von Tumorzelllinien Zelltod durch Apoptose auszulösen (Bertrand et al., 1994). Die unter den gewählten Versuchsbedingungen beobachteten Wirkungen von Staurosporin auf C6-Zellen werden im folgenden Abschnitt beschrieben. Die Exposition der C6-Zellen mit Staurosporin erfolgte am sechsten Kulturtag in den Konzentrationen 0,1 $\mu\text{g/ml}$ und 1 $\mu\text{g/ml}$. Die Veränderungen in der Morphologie der C6-Zellen wurden mit dem Phasenkontrastmikroskop verfolgt. Zum Nachweis des apoptotischen Zelltods diente die Messung der Caspase-3-Aktivität und die Veränderungen in der Zellkernmorphologie.

3.2.1 Morphologie der Zellen

Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3 zeigen die phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen von C6-Zellen nach Behandlung mit Staurosporin.

In Abbildung 3.2 sind die Zellen mit Staurosporin in den Konzentrationen 0,1 $\mu\text{g/ml}$ und 1 $\mu\text{g/ml}$ behandelt worden. Die Aufnahmen erfolgten nach den Expositionszeiten 4 und 24 h. Die Zellen wurden in der für die Versuche vorgesehenen Aussaatdichte von 1 Million Zellen pro Schale (siehe Versuchsaufbauten 2.5.2.1) ausgesät. Die phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen der C6-Zellen zeigen, wie sich die Morphologie der Zellen über die Dauer der Staurosporin-Exposition veränderte.

Mit fortschreitender Behandlungsdauer wurden die Fortsätze der Zellen dünner oder verschwanden ganz. Entlang der Fortsätze waren winzige Bläschen erkennbar. Die Zelleiber schrumpften zu kleinen hellleuchtenden Punkten zusammen. Der zu Beginn der Exposition noch dichte Zellteppich wies mit zunehmender Expositionszeit immer größere Lücken auf. Erste Schäden zeigten sich bei 1 $\mu\text{g/ml}$ bereits nach 4 h während diese bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$ zeitlich verzögert nach 24 h deutlich wurden. Die

3 Ergebnisse

erkennbaren Schäden der Zellen waren in der Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ deutlich geringer als bei 1 $\mu\text{g/ml}$. Nach 24 h waren die meisten Zellleiber in der Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ klein und abgekugelt. Der ehemals konfluente Zellrasen wies große Lücken auf. Bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$ waren in der Hauptsache die Fortsätze dünner, der Großteil der Zellkörper war noch nicht zusammengeschrumpft.

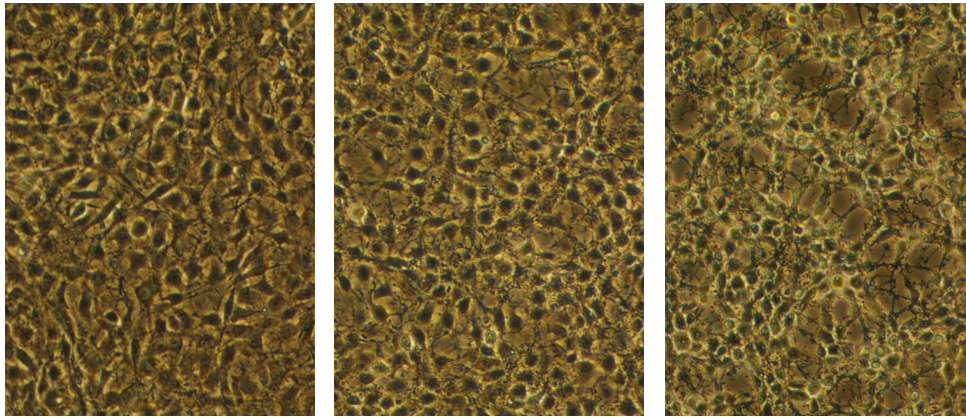
Um die morphologischen Veränderungen besser dokumentieren zu können, wurden die Zellen für die in der Bilderserie 3.3 gezeigten Aufnahmen in einer geringeren Dichte ausgesät (1×10^5 Zellen pro 100 mm Schale). Für diesen Versuch wurde nur eine 100 mm Schale angelegt, mit dem Ziel die Wirkungen des Staurosporins auf die Zellen an derselben Stelle in der Kulturschale zeitlich zu verfolgen und photographisch festzuhalten. Wie in Abbildung 3.3 erkennbar, wiesen die C6-Zellen vor der Exposition eine sternförmige Form auf. Die Fortsätze wuchsen in alle Richtungen, waren lang gestreckt und verknüpften die Zellen untereinander zu einem dichten Netz. Bereits nach einstündiger Exposition erschienen die Fortsätze verdünnt. Zudem waren an den Fortsätzen kleine Abschnürungen oder Bläschen erkennbar. Dieses Bild verstärkte sich über die Dauer der Exposition. Nach 24 h waren die Fortsätze fast vollständig verschwunden und die Zellleiber zu kleinen Punkten zusammengeschrumpft. Die Haftung der Zellen am Schalenboden nahm erst zu diesem Zeitpunkt deutlich ab.

4 h:

Kontrolle

0,1 $\mu\text{g/ml}$

1,0 $\mu\text{g/ml}$



24 h:

Kontrolle

0,1 $\mu\text{g/ml}$

1,0 $\mu\text{g/ml}$

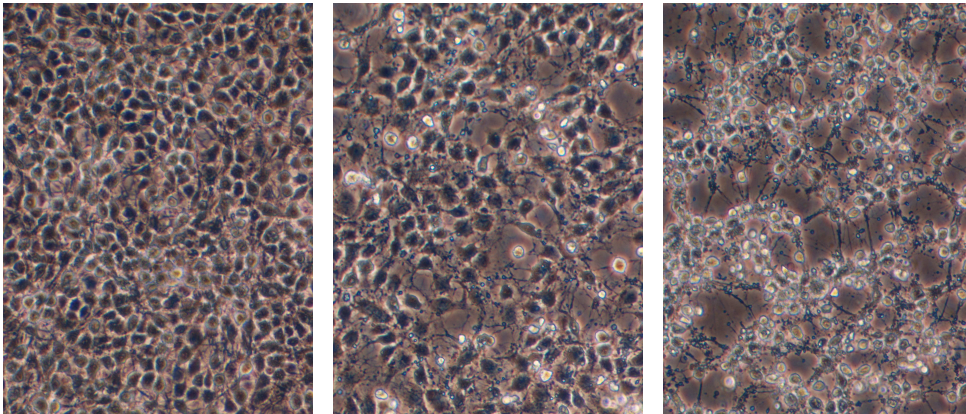


Abbildung 3.2: **Morphologische Veränderungen von C6-Zellen nach Staurosporin-Exposition mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ und 1 $\mu\text{g/ml}$**
Schädigung der C6-Zellen nach 4 h und 24 h durch Staurosporin. Die Exposition der Zellen erfolgte am sechsten Kulturtag. Die Aussaatdichte betrug 1×10^6 Zellen pro 100 mm Schale. (Aufnahme: Umkehrmikroskop Olympus, Vergrößerung $\times 200$)

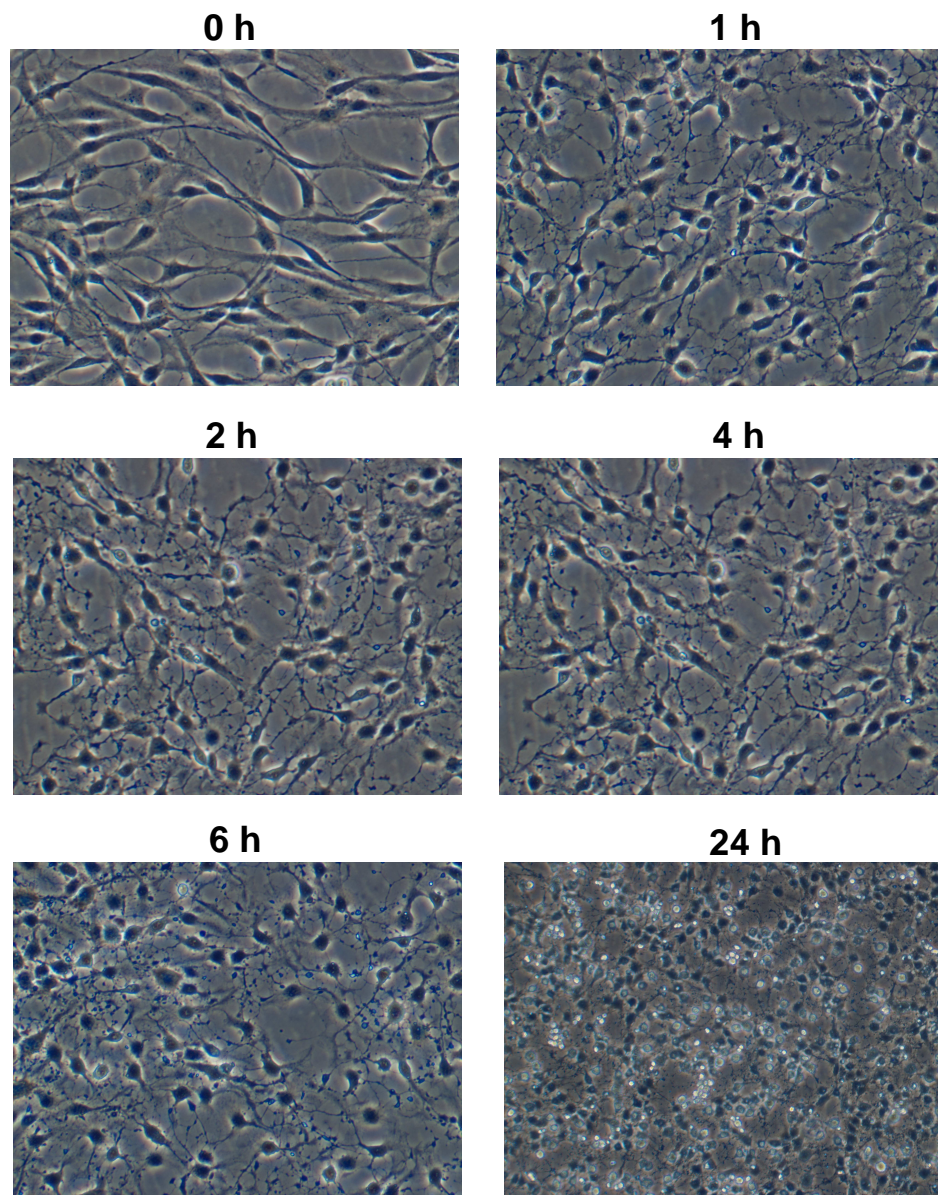


Abbildung 3.3: **Zeitliche Abfolge morphologischer Veränderungen von C6-Zellen nach Staurosporin-Behandlung**

Gezeigt sind C6-Zellen nach Exposition mit Staurosporin über 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h. Die Exposition der Zellen erfolgte am sechsten Kulturtag mit einer Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$. Die Aussaatdichte betrug 1×10^5 Zellen pro 100 mm Schale. (Aufnahme: Umkehrmikroskop Olympus, Vergrößerung $\times 200$)

3.2.2 Zellkernmorphologie

Durch die Anfärbung der Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst 33342 und Propidiumjodid wurden morphologische Veränderungen der Zellkerne nach Staurosporin-Exposition sichtbar. Abbildung 3.4 zeigt beispielhaft fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen, die über die Dauer von 24 h mit Staurosporin behandelt worden sind. Nach vier und deutlich nach sechsstündiger Staurosporin-Inkubation stieg die Zahl der apoptotischen Kerne an. Apoptotische Kerne zeichnen sich durch ein hochkondensiertes Chromatin aus, welches sich in vielen Kernen halbmondförmig am Kernmembranrand anlagert und oft in einzelne Fragmente zerfallen ist. Die Farbe der apoptotischen Kerne ist im Gegensatz zu Kernen lebender Zellen hellleuchtend blau oder weiß. Nach 24 h nahm der Anteil der spätapoptotischen Kerne im Vergleich zu den apoptotischen Kernen durch Verlust der Zellmembranintegrität zu. Diese Kerne sind durch das Eindringen von Propidiumjodid durch die mittlerweile permeable Zellmembran hellrot gefärbt. Das Chromatin spätapoptotischer Kerne ist ebenfalls hochkondensiert und fragmentiert. Die Zahl nekrotischer Zellen, kenntlich an den roten, vergrößerten Zellkernen mit ähnlicher Struktur wie bei den Kernen lebender Zellen, veränderte sich über 24 h kaum.

Um eine quantitative Aussage über die Anteile lebender, apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Staurosporin-Behandlung zu treffen, wurden für jede zu untersuchende Konzentration und Expositionszeit jeweils 10 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen ausgewertet. Anhand der digitalisierten Bilder wurden die Zellkerne ausgezählt und eingeteilt nach Kernen lebender, nekrotischer, apoptotischer und spätapoptotischer Zellen. Abbildung 3.5 zeigt die quantitative Auswertung der Fluoreszenzbilder. Nach 4 bzw. nach 6 h stieg die Anzahl apoptotischer Kerne bei 1,0 $\mu\text{g/ml}$ bereits signifikant an. Bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$ war nach diesen Expositionszeiten noch kein Unterschied zur Kontrolle zu verzeichnen. Nach 24-stündiger Inkubation mit 1,0 $\mu\text{g/ml}$ waren 31 % der ausgezählten Zellen apoptotisch, mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ 6 %. Der Anteil apoptotischer Kerne unter Kontrollbedingungen blieb über die Dauer der Inkubation konstant und war stets unter 1 %. Somit führte die Behandlung mit Staurosporin zu einer Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen, und zwar in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration und der Expositionsdauer. Die Anzahl der nekrotischen Zellen blieb über den Zeitraum von 0-24 h auf Höhe des Kontrollniveaus (vgl. Abb.

3 Ergebnisse

3.5 B). Durch Inkubation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Staurosporin nahm die Zahl nekrotischer Zellen sogar leicht, aber signifikant ab.

3 Ergebnisse

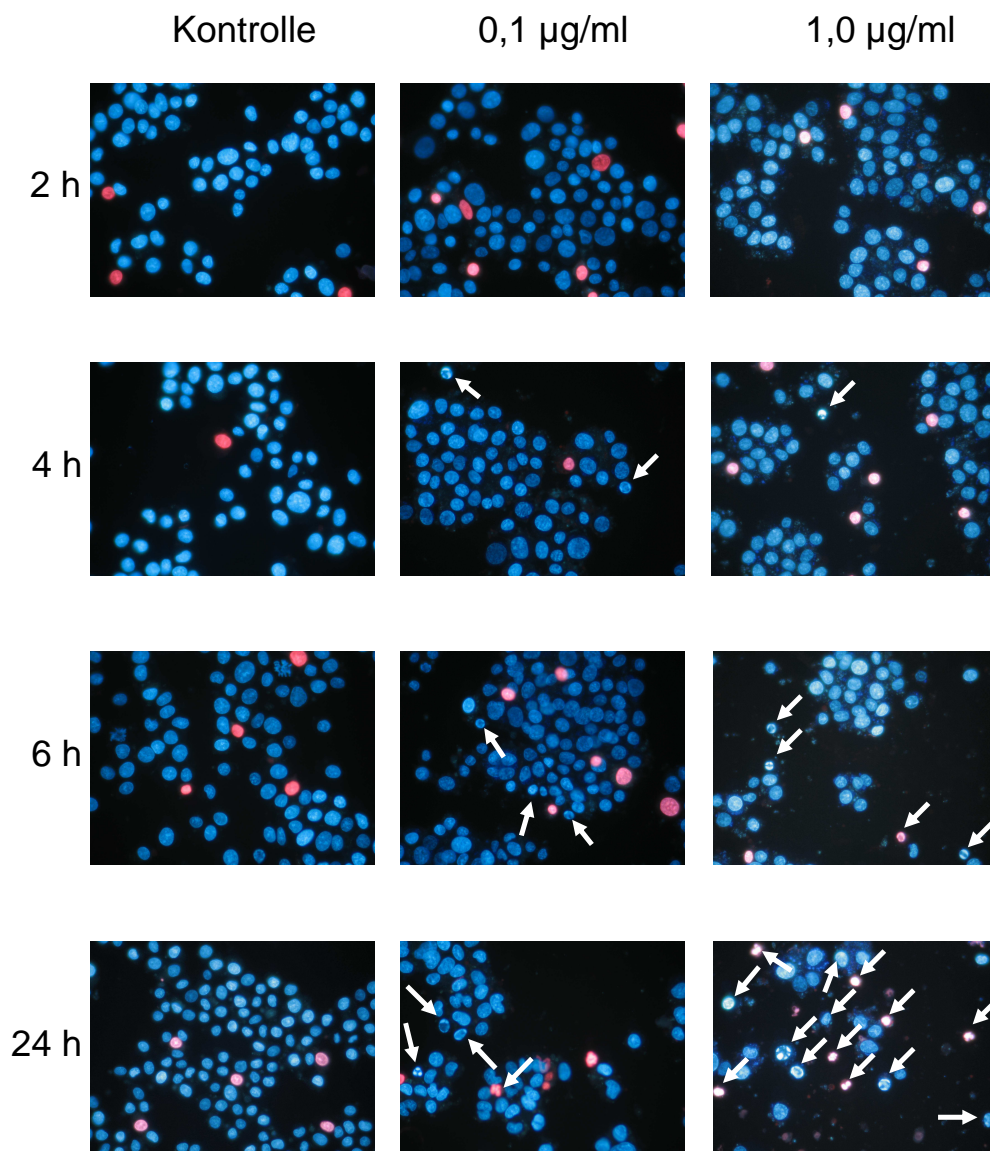


Abbildung 3.4: **Morphologische Veränderungen von C6-Zellkernen nach Behandlung mit Staurosporin**

Gezeigt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von C6-Zellkernen nach Anfärbung mit Hoechst 33342 und Propidiumjodid, die über 24 h mit Staurosporin in den Konzentrationen a) 0,1 $\mu\text{g/ml}$ und b) 1,0 $\mu\text{g/ml}$ behandelt worden sind. Die weißen Pfeile indizieren apoptotische bzw. spätapoptotische Kerne.

3 Ergebnisse

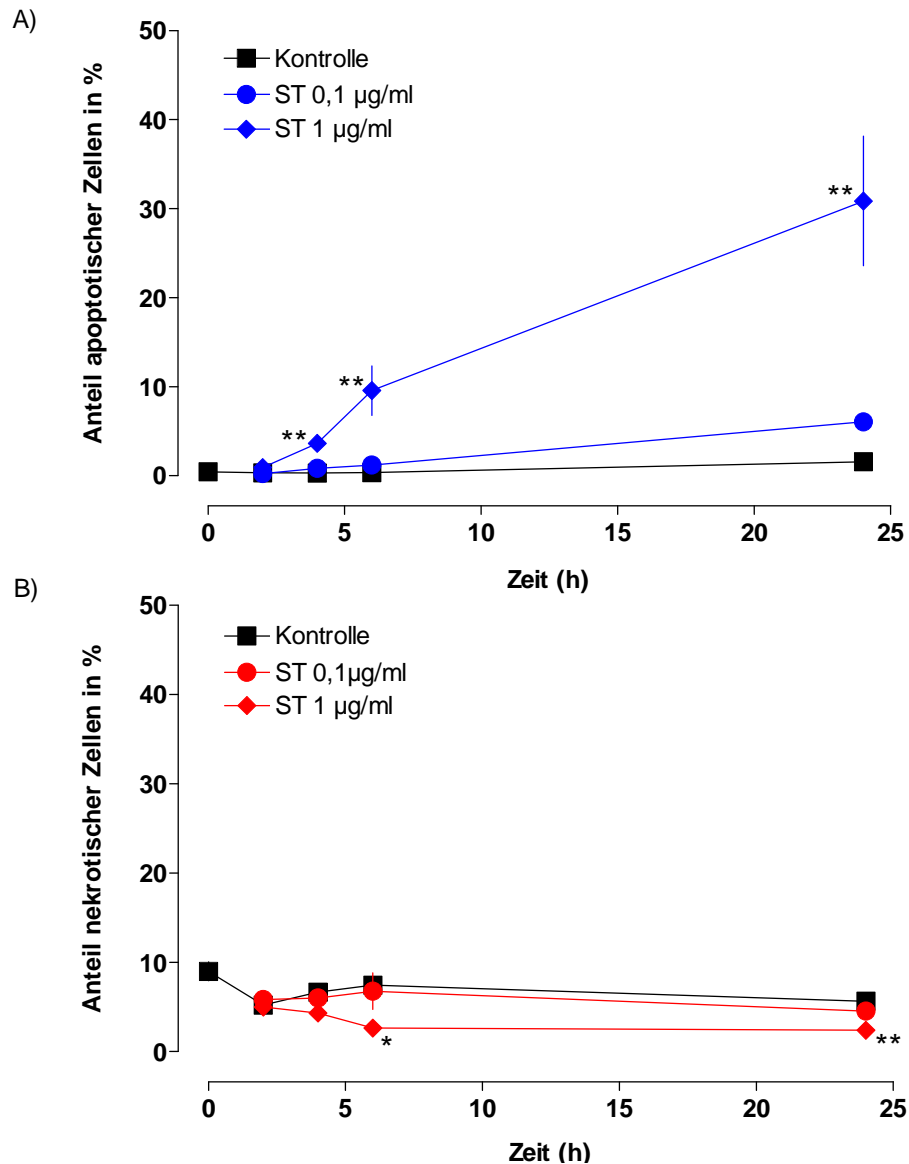


Abbildung 3.5: Induktion von Apoptose (A) und Nekrose (B) durch Staurosporin in C6-Zellen

Wirkung von Staurosporin in den Konzentrationen 0,1 µg/ml und 1 µg/ml auf den Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen in % der analysierten (ausgezählten) Zellen über den Zeitraum von 0 - 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=6 Experimenten; *p < 0,05; **p < 0,01 verglichen mit den jeweiligen Kontrollen.

3.2.3 Proteingehalt der Kulturen

In Abbildung 3.6 wird der Zellverlust nach Behandlung mit Staurosporin über die Zeit betrachtet.

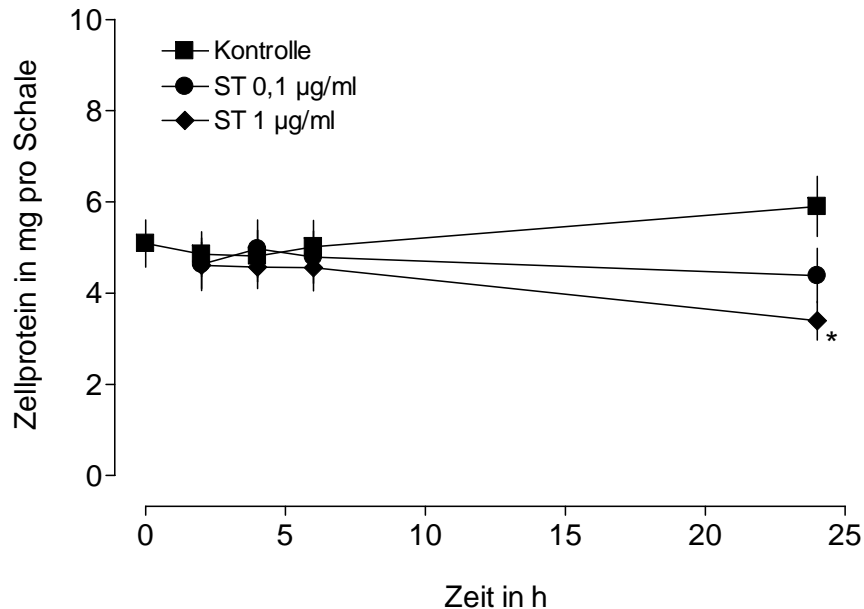


Abbildung 3.6: **Zellverlust durch Staurosporin-Exposition**

Wirkung von Staurosporin in den Konzentrationen 0,1 µg/ml und 1 µg/ml auf den Zellproteingehalt in mg pro Schale über den Zeitraum von 0 - 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ Experimenten; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit den jeweiligen Kontrollen.

Abbildung 3.6 zeigt, dass unter den gewählten Bedingungen (kein FBS im Medium) kein bzw. nur ein sehr geringes Wachstum der Zellkulturen stattfand. In den Kontrollen blieb der Gesamtgehalt an Zellprotein, bestimmt in mg pro Schale, über 24 h nahezu konstant. Auch in den mit Staurosporin behandelten Kulturen veränderte sich der Zellproteingehalt im Vergleich zur Kontrolle über die ersten 6 h kaum, nahm dann aber nach 24 h signifikant ab. Bei 1 µg/ml Staurosporin reduzierte sich der Zellproteingehalt auf 2/3 des ursprünglichen Zellproteingehalts. Die Reduktion ist somit stärker ausgeprägt als bei der zehnfach niedrigeren Konzentration. Der Verlust

an Zellprotein im Vergleich zur Kontrolle ist gleichzusetzen mit dem Anteil der integrierten Zellen. Diese würden bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse nicht erfasst werden.

3.2.4 Caspase-3-Aktivität

Die Caspase-3-Aktivität wurde nach 0, 2, 4, 6, und 24-stündiger Exposition der C6-Zellen mit Staurosporin durch eine kolorimetrische Bestimmung, die auf der Abspaltung von p-Nitroanilin vom Peptidsubstrat DEVD beruht, gemessen.

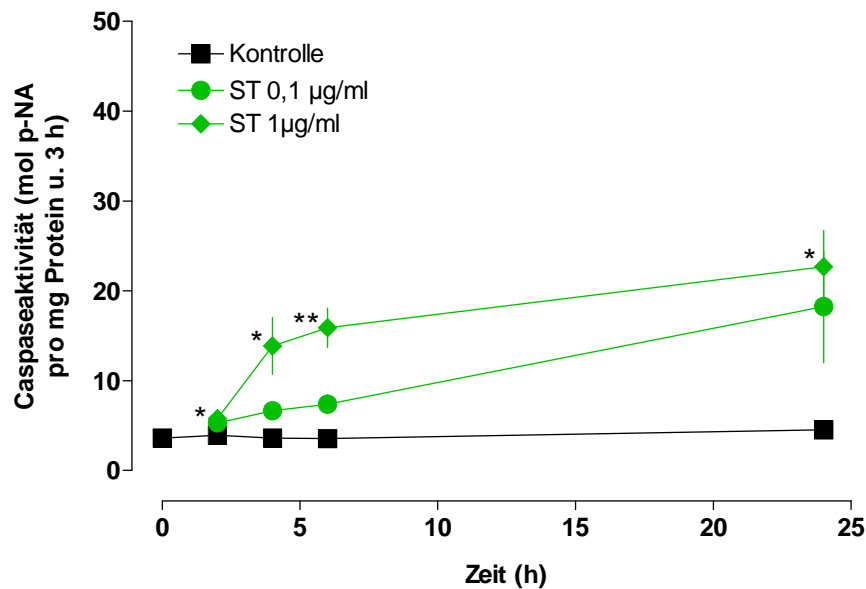


Abbildung 3.7: **Induktion von Apoptose in C6-Zellen durch Staurosporin**

Wirkung von Staurosporin in den Konzentrationen 0,1 µg/ml und 1 µg/ml auf die Aktivität der Caspase-3 über den Zeitraum von 0-24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n=3$ Experimenten; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit den jeweiligen Kontrollen

Es zeigte sich, dass der Anstieg in der Zahl apoptotischer Kerne mit einem Anstieg der Caspase-3-Aktivität einherging. Bereits nach 4 h war bei der Exposition mit

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine deutliche Steigerung in der Caspase-3-Aktivität erkennbar. Die Steigung fiel nach 6 bis 24-stündiger Exposition geringer aus als nach 4 h. Nach 6 h lag der Wert für die Caspase-3-Aktivität um das fünffache höher als der Kontrollwert. Bei 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nahm die Caspase-3-Aktivität über die gesamte Inkubationszeit kontinuierlich zu und erreichte ihren höchsten Wert nach 24 h. Die Zunahme bei 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trat in allen Versuchen auf, ist also reproduzierbar, jedoch statistisch wegen des geringen Stichprobenumfanges nicht signifikant. Die Caspase-3-Aktivität lag zu allen Messzeitpunkten mit 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Staurosporin unterhalb der Aktivität, die durch 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ induziert wurde.

3.2.5 Übersicht über die zeitabhängigen Effekte von Staurosporin

Abbildung 3.8 gibt Aufschluss über die zeitlichen Abfolge der Ereignisse bei der Inkubation der C6-Zellen mit Staurosporin. Dargestellt sind die Zellfraktionen bezogen auf die Gesamtpopulation.

Die Inkubation mit 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ führte zu keinem nennenswerten Anstieg des Anteils apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen (Abb. 3.8). Demgegenüber stieg aber der Anteil desintegrierter Zellen während der Inkubation kontinuierlich an und erreichte nach 24 h seinen höchsten Wert von 25 %. Mit anderen Worten war ein Viertel der Zellpopulation während der Exposition gestorben und anschließend in Zellbestandteile aufgelöst worden. Bemerkenswerterweise zeigte die Aktivität der Caspase-3 einen ganz ähnlichen zeitlichen Verlauf. Im Vergleich zu 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Staurosporin führte die vierstündige Inkubation mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Staurosporin zu einer Aktivitätssteigerung der Caspase-3 um das vierfache ihres Kontrollwertes, nach 6 h um das fünffache. Nach 6 h zeigte sich kein weiterer Anstieg der Caspase-3-Aktivität (vgl. Abb. 3.8). Einhergehend mit der Aktivierung der Caspase-3, aber zeitlich versetzt, erhöhte sich der Anteil der apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Der Anteil der apoptotischen Zellen stieg bis 6 h deutlich an, erhöhte sich danach aber nicht mehr. Demgegenüber nahm der Anteil der spätapoptotischen Zellen kontinuierlich zu und erreichte nach 24 h mit 16 % seinen höchsten Wert. Nach vierundzwanzigstündiger Inkubation mit Staurosporin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) war auch die Zahl der desintegrierten Zellen, bestimmt durch

3 Ergebnisse

den Zellproteinverlust im Vergleich zur Kontrolle, mit 37,1% am höchsten. Nach 6 h zeigten sich im Anteil der desintegrierter Zellen noch keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Der Wert lag bei 8 %.

Somit beginnt der apoptotische Zelltod in C6-Zellen ausgelöst durch Staurosporin mit einer deutlichen Aktivierung der Caspasen nach 4 h gefolgt von den ersten morphologisch erkennbaren Veränderungen der Zellkerne nach 6 h kenntlich durch eine Verdichtung des Chromatins. Viele dieser apoptotischen Kerne wurden durch den Verlust der Zellmembranintegrität nach 24 h spätapoptotisch oder waren bereits durch die völlige Auflösung der Zellen (sekundäre Nekrose) ganz verschwunden.

3 Ergebnisse

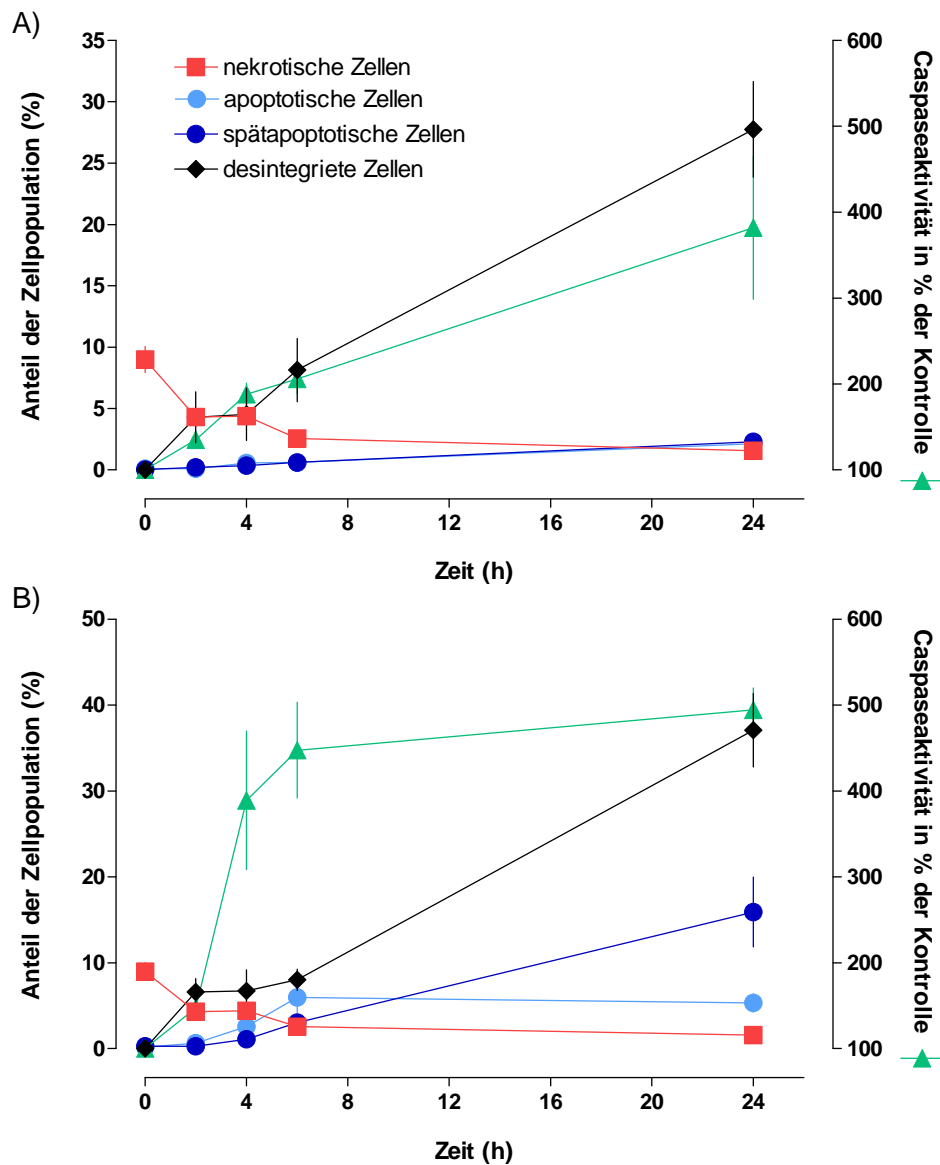


Abbildung 3.8: **Zytoletale Wirkung von Staurosporin und Aktivierung der Caspase-3**

Die Zellen wurden mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (vgl. Abbildung A) und 1,0 $\mu\text{g/ml}$ (vgl. Abbildung B) Staurosporin behandelt und über 24 h inkubiert. Gezeigt sind die Anteile apoptotischer, spätapoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen in % bezogen auf die Gesamtpopulation. Die Aktivität der Caspase-3 ist in % zur Kontrolle angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ Experimenten bzw. $n = 3$ Experimenten für die Caspase-3-Aktivität

3.3 Peroxid-induzierter Zelltod

3.3.1 Zytotoxizität von H_2O_2 , CHP und tert-BuOOH

Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurden die Zellen über einen Zeitraum von 48 h mit den Peroxiden H_2O_2 , CHP oder tert-BuOOH in 96-Well-Platten inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Expositionszeit wurde der Proteingehalt der noch angehefteten Zellen bestimmt. Wie in Abbildung 3.9 gezeigt, veränderte sich der messbare Proteingehalt pro Well in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration und der Expositionszeit des jeweiligen Peroxids. Das Sterben der C6-Zellen ist somit konzentrations- und zeitabhängig. Je länger die Expositionszeit, desto geringer die Peroxidkonzentration, die nötig ist, um die Hälfte der vorhandenen Zellen zu töten (EC_{50} -Wert). Infolge dessen sind die Kurven nach längerer Exposition nach links verschoben.

Wie in Abbildung 3.9 gezeigt, unterscheiden sich die Peroxide in ihrer „zytotoxischen Kinetik“ voneinander. Dies macht auch ein Vergleich der EC_{50} -Werte deutlich (vgl. Tabelle 3.3.1). Nach Ablauf einer Stunde wirkte H_2O_2 in deutlich geringeren Konzentrationen zytotoxisch als CHP oder tert-BuOOH. Bei H_2O_2 lag der EC_{50} -Wert nach dieser Expositionszeit bei $686 \mu\text{M}$, während die EC_{50} -Werte für CHP und tert-BuOOH oberhalb von $1000 \mu\text{M}$ lagen. Anders gesagt, die toxischen Wirkungen von H_2O_2 setzen bei einer ausreichend hohen Konzentration (z.B. $500 \mu\text{M}$) schneller ein als bei den organischen Peroxiden.

Nach zwei Stunden und deutlicher noch nach vierstündiger Exposition zeigte wiederum CHP im Vergleich zu tert-BuOOH und H_2O_2 die größte zytotoxische Potenz. Der EC_{50} -Wert lag für CHP nach 4 h bei $16,5 \pm 1,9 \mu\text{M}$ (Mittelwert \pm SEM), während dieser bei tert-BuOOH bei $57,7 \pm 8,9 \mu\text{M}$ und bei H_2O_2 bei $89,0 \pm 14,9 \mu\text{M}$ lag. Gleichzeitig war nach 4 h die maximale zytotoxische Wirkung von CHP erreicht. Die Kurven für die Inkubation von 24 und 48 h unterschieden sich nur noch minimal von der Kurve für 4 h. Dies spiegelte sich auch im EC_{50} -Wert wieder. Dieser lag nach 24 h bei $11,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$ und nach 48 h bei $10,5 \pm 1,3 \mu\text{M}$. Die toxische Wirkung setzte bei CHP also langsamer ein als bei H_2O_2 , die Zytoletalität war dann aber umso größer.

3 Ergebnisse

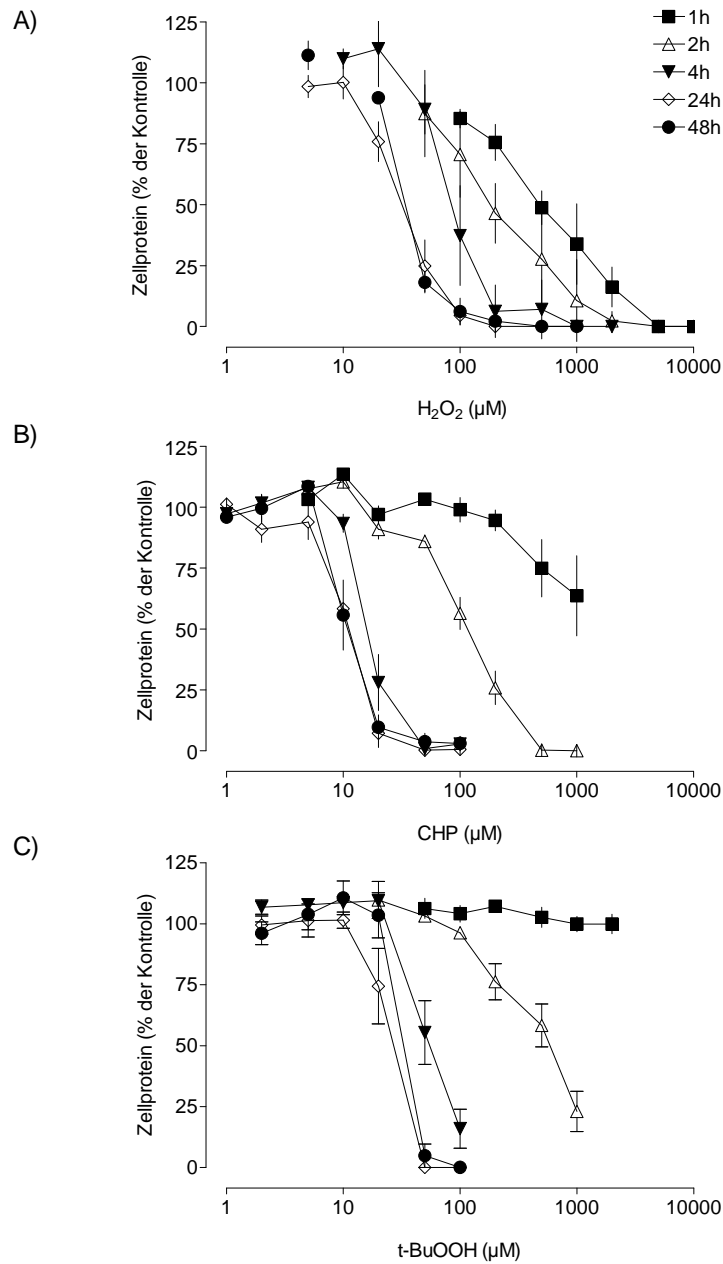


Abbildung 3.9: **Zytotoxizität der Peroxide**

Gezeigt ist der Zellproteingehalt pro Well nach 1-, 2-, 4-, 24- und 48-stündiger Exposition mit den Peroxiden H₂O₂ (A), CHP (B) und tert-BuOOH (C). Für jede Peroxidkonzentration sind die Werte in % zur unbehandelten Kontrolle angegeben und als Mittelwerte (\pm SEM) aus jeweils 3 voneinander unabhängigen Versuchen berechnet worden.

3 Ergebnisse

Die zytotoxische Wirkung von tert-BuOOH setzte verglichen mit der von CHP und H₂O₂ am langsamsten ein. Nach 2 h lag der EC₅₀-Wert bei 526,4 μ M, sank aber nach Ablauf von 24 bzw. 48 h auf Werte ab, die mit denen von H₂O₂ vergleichbar waren.

Tabelle 3.1: **Zytotoxische Potenz von H₂O₂, CHP und tert-BuOOH**

Für die Peroxide H₂O₂, CHP und tert-BuOOH sind die EC₅₀-Werte als Mittelwerte \pm SEM von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen gezeigt. Der EC₅₀-Wert ist die Konzentration (μ M), bei der der Zellproteingehalt pro Well im Vergleich zur Kontrolle um 50 % reduziert wird. Die EC₅₀-Werte wurden den in Abb. 3.9 dargestellten Zytotoxizitätskurven entnommen.

Zeit (h)	EC ₅₀ H ₂ O ₂	EC ₅₀ CHP	EC ₅₀ tert-BuOOH
1	686,3 \pm 302,6	>1000	>2000
2	250,1 \pm 94,5	117,6 \pm 16,9	526,4 \pm 87,7
4	89,0 \pm 14,9	16,5 \pm 1,9	57,7 \pm 8,9
24	32,8 \pm 3,3	11,7 \pm 0,6	27,3 \pm 4,6
48	32,0 \pm 0,4	10,5 \pm 1,3	31,4 \pm 1,3

3.3.2 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Peroxide

Als Ursache für den Zelltod nach Peroxidexposition wird die Bildung von Radikalen und den damit einhergehenden oxidativen Zellschäden angenommen. Daher wurde im Folgenden die intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch CHP, tert-BuOOH und H_2O_2 mit der unter 2.6.2 beschriebenen Methode näher untersucht.

Zu diesem Zweck wurden C6-Zellen in 96-Well-Platten (clear bottom, black wall) ausgesät und nach 24 h mit dem Fluoreszenzfarbstoff $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ aufgeladen. Anschließend wurden die Zellen einer Platte mit verschiedenen Peroxidkonzentrationen behandelt und die emittierte Fluoreszenz nach Zugabe des jeweiligen Peroxids über die Dauer von 2 h im Fluorimeter gemessen. Als Kontrolle dienten Wells mit Zellen, die nicht gegenüber dem Peroxid exponiert worden sind. Die Angabe der Fluoreszenz erfolgte in Fluoreszenzeinheiten.

In Abbildung 3.10 sind die Ergebnisse für die Messungen mit den Peroxiden H_2O_2 , CHP und tert-BuOOH gezeigt. Alle drei Peroxide bewirkten eine schnelle Zunahme des Fluoreszenzsignals, die sofort nach der Zugabe des Peroxids einsetzte. $10\ \mu\text{M}$ H_2O_2 bzw. tert-BuOOH war die niedrigste Konzentration, die zu einer Erhöhung des DCF-Fluoreszenzsignals führte. Bei CHP setzte eine messbare Zunahme des Signals im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle bereits bei $5\ \mu\text{M}$ ein. Über die Zeit stieg die DCF-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration kontinuierlich an. Die absolute Höhe der Fluoreszenzsignale läßt sich bei den unterschiedlichen Peroxiden nur bedingt vergleichen. Die Versuche haben gezeigt, dass die untersuchten Peroxide in Abhängigkeit von der eingesetzten Peroxidkonzentration und der Expositionszeit eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals bewirken. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals dient als Maß für die intrazelluläre Radikalbildung und dem damit hervorgerufenen oxidativen Stress in C6-Zellen durch Peroxidexposition. Die Auswirkungen von oxidativem Stress auf C6-Zellen werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3 Ergebnisse

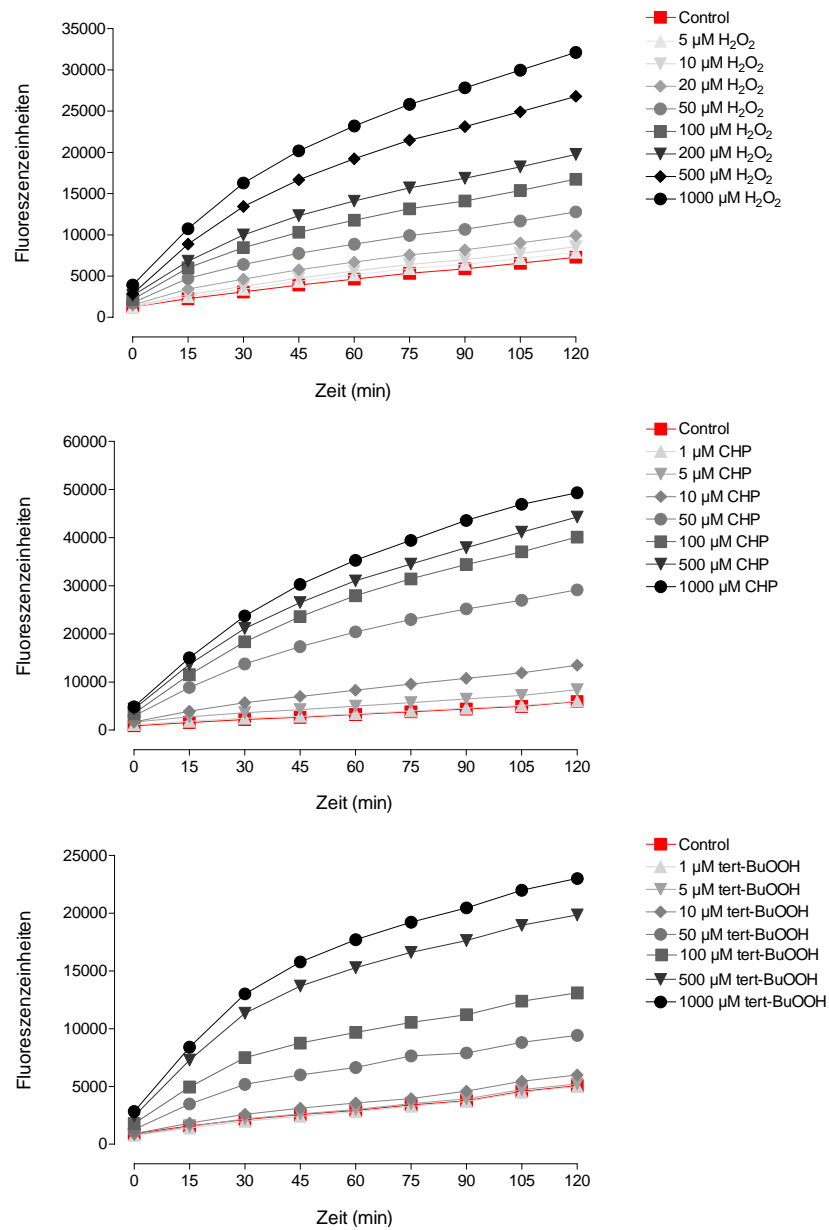


Abbildung 3.10: Radikalbildung ausgelöst durch H₂O₂, CHP und tert-BuOOH

Die Zellen wurden mit 10 μM H₂-DCF-DA für 30 Minuten aufgeladen. Die emittierte Fluoreszenz wurde kontinuierlich über 2 h während der Peroxidexposition gemessen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus 6 Wells.

3.3.3 Untersuchung des Wasserstoffperoxid-induzierten Zelltods

Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Art des ausgelösten Zelltods wurde nach dem unter 2.5.2.1 beschriebenen Versuchsprotokoll verfahren. In 100 mm Schalen angelegte Kulturen wurden über 24 h mit verschiedenen Peroxidkonzentrationen (0-50 mM) inkubiert. Die Veränderungen der Kerne wurden fluoreszenzmikroskopisch erfasst und die Aktivität der Caspase-3 gemessen.

3.3.3.1 Zelltod in Abhängigkeit von der eingesetzten H_2O_2 -Konzentration

Wie in Abbildung 3.11 gezeigt, waren bereits bei kleinen H_2O_2 -Konzentrationen (0,1 und 0,2 mM) etwa 20 % der Zellpopulation desintegriert. Der Prozentsatz der desintegrierten Zellen, also der Zellen, die bereits soweit zerstört sind, dass sie sich bei der angewendeten Drehzahl nicht mehr herunterzentrifugieren ließen, erhöhte sich mit steigender Peroxidkonzentration. In der höchsten eingesetzten Peroxidkonzentration (50 mM) war nach 24 h mehr als die Hälfte der gesamten Zellpopulation desintegriert.

Ein anderer Teil der Zellpopulation starb bei H_2O_2 -Exposition den nekrotischen Zelltod. Bei kleinen H_2O_2 -Konzentrationen waren die Prozentsätze nekrotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht. Bei höheren Peroxidkonzentrationen, etwa ab 5 mM, nahm der prozentuale Anteil nekrotischer Zellen zu und unterschied sich ab 10 mM signifikant von der unbehandelten Kontrolle. Somit gehen C6-Zellen durch den Einsatz von hohen H_2O_2 -Konzentrationen ausschließlich durch Nekrose zu Grunde.

Zu einem kleinen, aber signifikanten Anteil löste H_2O_2 in bestimmten Konzentrationen (0,1 - 0,2 mM) Zelltod durch Apoptose aus. Der Anteil apoptotischer Kerne erreichte mit 4 % bei 200 μ M seinen höchsten Wert. Mit steigenden H_2O_2 -Konzentrationen sank der Anteil apoptotischer Zellen wieder auf das Niveau der Kontrolle ab. Als weiterer Marker für den apoptotischen Zelltod wurde die Caspase-3-Aktivität gemessen. Im Konzentrationsbereich von 0,1 - 0,2 mM zeigte sich parallel zum Anstieg apoptotischer Zellen eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität, maximal etwa um

3 Ergebnisse

den Faktor 2,5. Hin zu höheren Konzentrationen sank die Aktivität wieder ab und war schließlich bei den höchsten H_2O_2 -Konzentrationen nicht mehr messbar. Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Auslösung des nekrotischen oder apoptotischen Zelltods von C6-Zellen abhängig ist von der bei der Exposition eingesetzten H_2O_2 -Konzentration. In der Hauptsache wird durch Wasserstoffperoxid in C6-Zellen nekrotischer Zelltod ausgelöst, bei bestimmten Konzentrationen aber auch zu einem kleinen Anteil Apoptose.

Um zu prüfen, ob die Art und Weise wie C6-Zellen durch H_2O_2 zu Grunde gehen vom Proliferationsstatus der Zellen abhängig ist, wurden Experimente mit proliferierenden Zellen durchgeführt. Für diese Versuche wurden 100 mm Kulturschalen mit geringerer Zelldichte (500.000 Zellen pro Schale) angelegt. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 3.12 gezeigt.

Es wurden Konzentrationen von 0,02 mM bis 10 mM über einen Expositionszeitraum von 24 h eingesetzt. Wie bei den wachstumsgehemmten Zellen waren auch bei den proliferierenden Zellen bereits bei kleinen H_2O_2 -Konzentrationen von 0,1 und 0,2 mM größere Anteile der Zellpopulation desintegriert. Bei 0,1 mM waren dies bereits 32 % der Zellpopulation. Mit steigender Peroxidkonzentration nahm der Anteil der desintegrierten Zellen stetig weiter zu. Durch die Exposition mit 10 mM H_2O_2 waren nach 24 h mehr als 60 % desintegriert. Im Vergleich zu den wachstumsgehemmten Zellen waren signifikante Unterschiede zur Kontrolle im prozentualen Anteil nekrotischer Zellen schon bei 1 mM statt 10 mM zu verzeichnen. Die höhere Empfindlichkeit der Zellen gegenüber H_2O_2 , sichtbar durch den etwas höheren Anteil desintegrierter Zellen und die leichte Verschiebung der nekrotischen Wirkung hin zu niedrigeren Konzentrationen, könnte durch die geringere Aussaatdichte und damit auch niedrigere Zellkonzentration zum Zeitpunkt der Vergiftung begründet sein. Dies konnte durch Ergebnisse aus unserem Labor bestätigt werden (Gülden et al., 2010). Apoptose wurde bei den proliferierenden Zellen ähnlich wie bei den wachstumsgehemmten Zellen bei niedrigen H_2O_2 Konzentrationen ausgelöst. Eine maximale Induktion von Apoptose wurde bereits bei 100 μM erreicht. Hin zu höheren Konzentrationen sank der Anteil apoptotischer Zellen wieder auf das Niveau der Kontrolle ab. Das Ausmaß der Induktion von Apoptose unterschied sich nicht zu den im Wachstum gehemmten Zellen und nahm nur einen kleinen prozentualen Anteil der Zellpopulation von

3 Ergebnisse

maximal 6 % ein. Ähnlich wie bei den wachstumsgehemmten Zellen war der Anstieg apoptotischer Zellen in den Konzentrationen 0,1 und 0,2 mM durch einen Aktivitätsanstieg der Caspase-3 begleitet. Im Vergleich zu den wachstumsgehemmten Zellen bestand auch hier kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Caspaseaktivität. Aus den Ergebnissen der Versuche lässt sich schließen, dass der Proliferationsstatus der C6-Zellen keinen Einfluss auf die Art des durch H₂O₂ hervorgerufenen Zelltods hat.

3 Ergebnisse

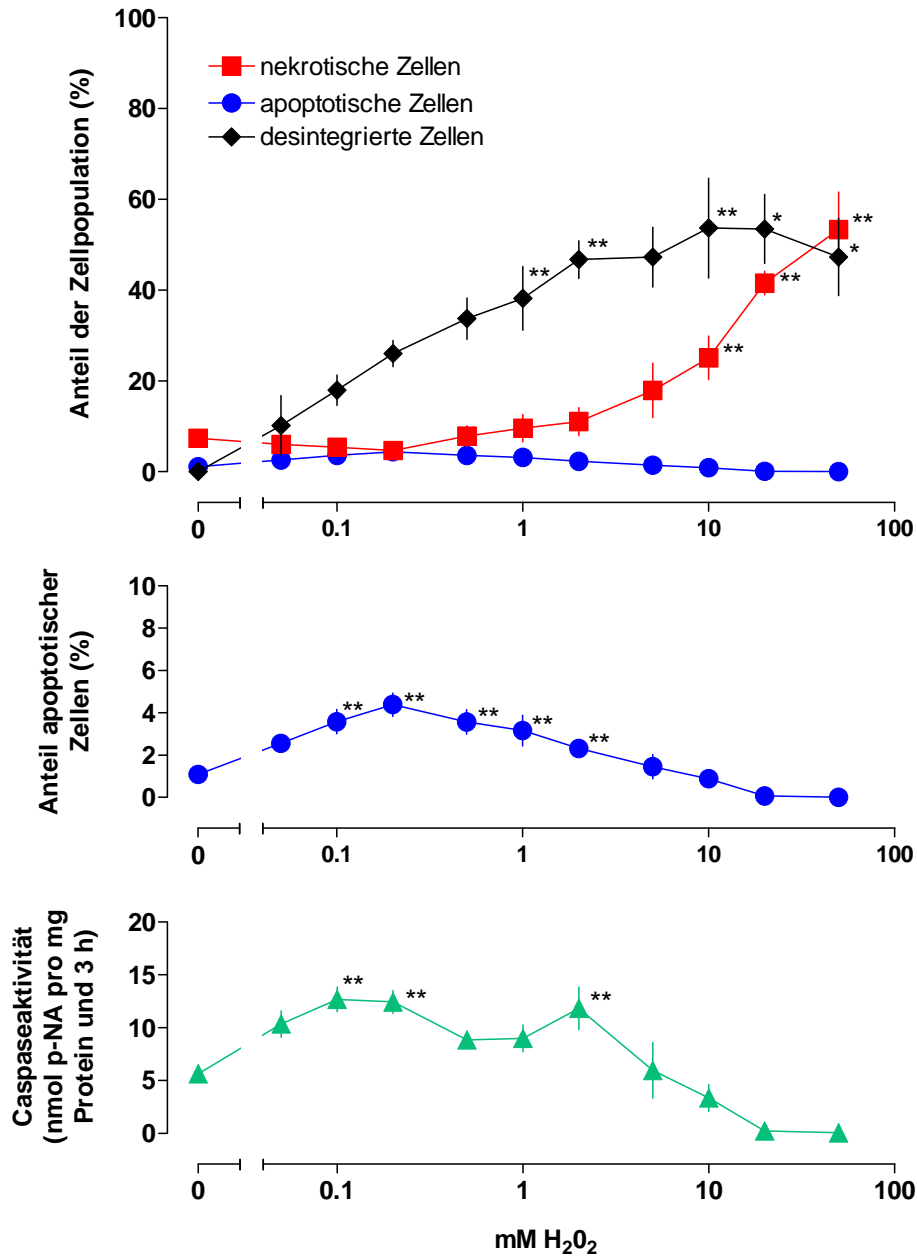


Abbildung 3.11: **Konzentrationsabhängigkeit der zytoletalen Wirkung von H₂O₂ auf wachstumsgehemmte C6-Zellen**
Gezeigt werden die Wirkungen verschiedener H₂O₂-Konzentrationen auf wachstumsgehemmte C6-Zellen nach 24 h. Die prozentualen Anteile apoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen sind auf die Gesamtpopulation bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 14 Experimenten; *p < 0,05; **p < 0,01 verglichen mit den jeweiligen Kontrollen.

3 Ergebnisse

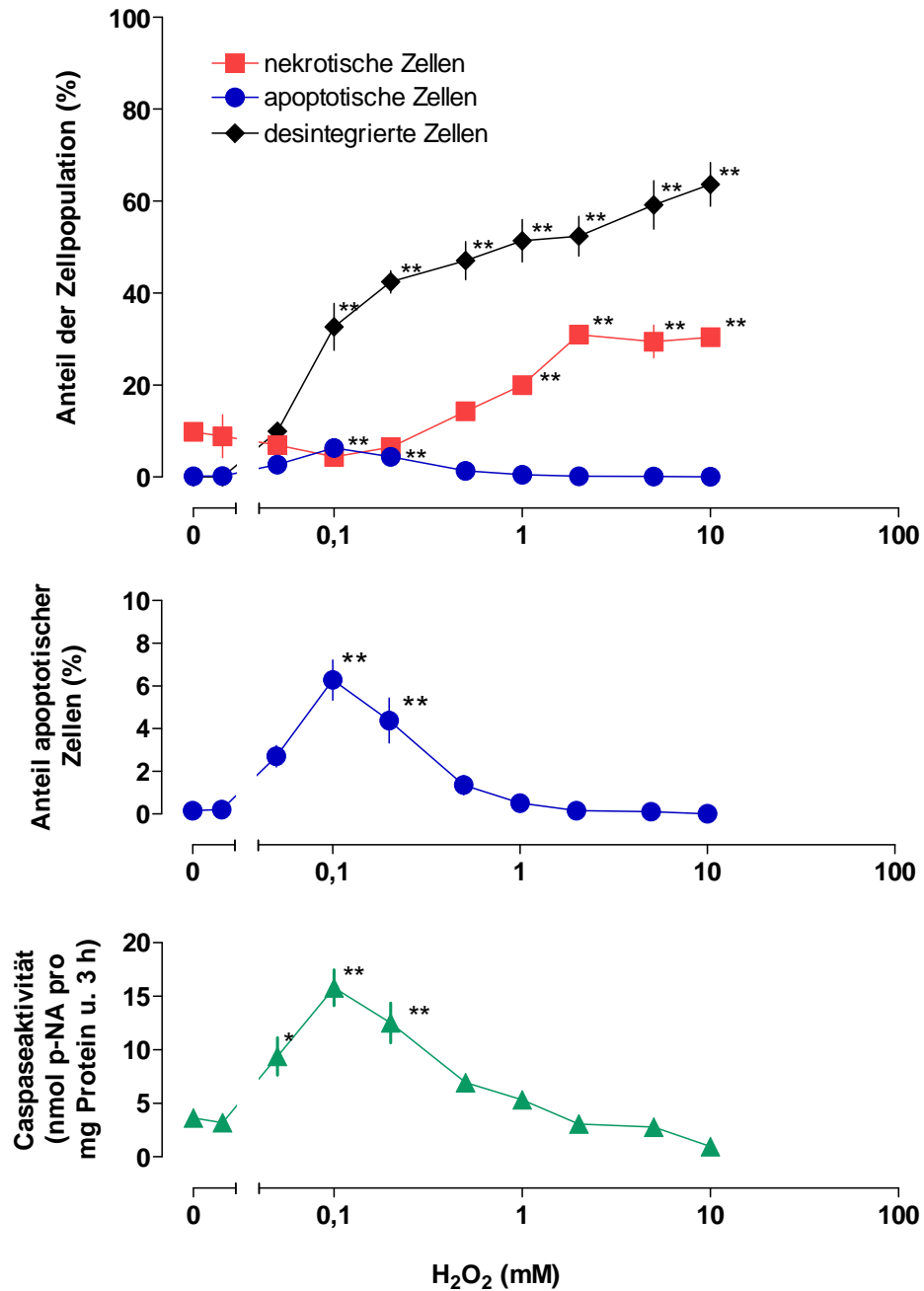


Abbildung 3.12: **Konzentrationsabhängigkeit der zytoletalen Wirkung von H₂O₂ auf proliferierende C6-Zellen**

Gezeigt werden die Wirkungen verschiedener H₂O₂-Konzentrationen auf proliferierende C6-Zellen nach 24 h. Die prozentualen Anteile apoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen sind auf die Gesamtpopulation bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 3 Experimenten; *p < 0,05; **p < 0,01 verglichen mit den jeweiligen Kontrollen.

3.3.3.2 Einfluss der Expositionszeit

Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Wirkung von H_2O_2 auf den Zelltod von C6-Zellen wurden wie unter 2.5.2.1 beschrieben Kulturen in 100 mm Schalen angelegt. Die Zellen wurden über 2, 6, 24 und 48 h mit den H_2O_2 -Konzentrationen 0,1; 0,2; und 2 mM exponiert.

In Abbildung 3.13 und 3.14 ist der Einfluss der Expositionszeit auf die Art des Zelltods von C6-Zellen dargestellt. Die in Abbildung 3.13 A gezeigte Desintegration der C6-Zellen nahm in Abhängigkeit von der Länge der Expositionszeit bei den drei eingesetzten H_2O_2 -Konzentrationen zu. Die Zunahme der Desintegration von Zellen über die Zeit wurde durch die Abnahme des Zellproteins pro Kulturschale verdeutlicht, aus der der prozentuale Anteil der desintegrierten Zellen berechnet wurde. In Abhängigkeit von der Höhe der eingesetzten Peroxidkonzentration stieg, wie schon bei den Versuchen zur Konzentrationsabhängigkeit demonstriert, der Anteil der desintegrierten Zellen an. Somit waren nach 48 h bei 2 mM H_2O_2 knapp die Hälfte der Zellen desintegriert. Der Anteil verringerte sich bei 0,2 mM auf 30,2 % und bei 0,1 mM auf 20,4 % nach 48 h.

Aus der Abbildung 3.13 wird deutlich, dass der nekrotische Zelltod innerhalb kurzer Zeit nach Peroxidzugabe einsetzte. So ergaben die Auswertungen der fluoreszenzmikroskopischen Analysen nach 2 h bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 2 mM H_2O_2 bereits 25,6 % nekrotische Zellen (bezogen auf die Gesamtpopulation). Der Prozentsatz nekrotischer Zellen verringerte sich nach 24-stündiger Exposition bis auf das Niveau der Kontrollen, während gleichzeitig der Anteil desintegrierter Zellen als Resultat fortschreitender Nekrose anstieg. Die Nekrose auslösende Wirkung war bei den niedrigeren Konzentrationen 0,1 mM und 0,2 mM geringer als bei 2 mM und unterschied sich nicht von der Kontrolle. Dies zeigte sich auch im geringeren Anteil desintegrierter Zellen bzw. am Proteingehalt pro Schale. Während der nekrotische Zelltod bereits innerhalb der ersten 2 h eintrat, wurden in den Versuchen zur Zeitabhängigkeit Merkmale des apoptotischen Zelltods nach 24 h sichtbar. Somit wurde Apoptose durch H_2O_2 im Vergleich zu Staurosporin, durch dessen Einwirkung erste apoptotische Zellen schon nach 4 h auftraten, verzögert ausgelöst. Dies machen die unter 3.15 gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen deutlich. Die ersten apoptotischen Kerne zeigten sich nach 24 h und waren in ähnlicher Anzahl auch

3 Ergebnisse

nach 48 h zu finden. Ein maximaler prozentualer Anteil von 5,2 % apoptotischer Zellen wurde durch 0,2 mM H_2O_2 gebildet. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen sank wiederum mit steigender Peroxidkonzentration.

Einhergehend mit dem durch H_2O_2 -Exposition hervorgerufenen Anstieg apoptotischer Zellen verdreifachte sich nach 24 h die Aktivität der Caspase-3 im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Abb. 3.14), während nach 2- und 6-stündiger Exposition noch kein Aktivitätsanstieg zu verzeichnen war. Nach 48-stündiger Exposition war die Caspase-3-Aktivität wieder auf die Höhe des Kontrollniveaus abgesunken, während der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen gegenüber 24 h unverändert blieb. Bei den apoptotischen Kernen handelt es sich jetzt wie aus Abbildung 3.15 ersichtlich hauptsächlich um spätapoptotische Kerne.

Die Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit zeigen, dass die mit H_2O_2 exponierten C6-Zellen in der Hauptsache per Nekrose zu Grunde gehen. Ein Großteil der Zellen stirbt dabei in den ersten 4 h. Im Zuge fortschreitender Nekrose und Zerfall der Zellen nimmt der Anteil der desintegrierten Zellen im Verlauf der Exposition zu. Nur in einem schmalen Konzentrationsfenster und nur in einem kleinen Teil der Zellpopulation findet Zelltod durch Apoptose statt. Darüber hinaus wird der apoptotische Zelltod im Vergleich zu Staurosporin zeitverzögert ausgelöst. Erste apoptotische Zellen werden nach 24 h beobachtet, während diese bei Staurosporin-Exposition schon nach 4 h auftreten.

3 Ergebnisse

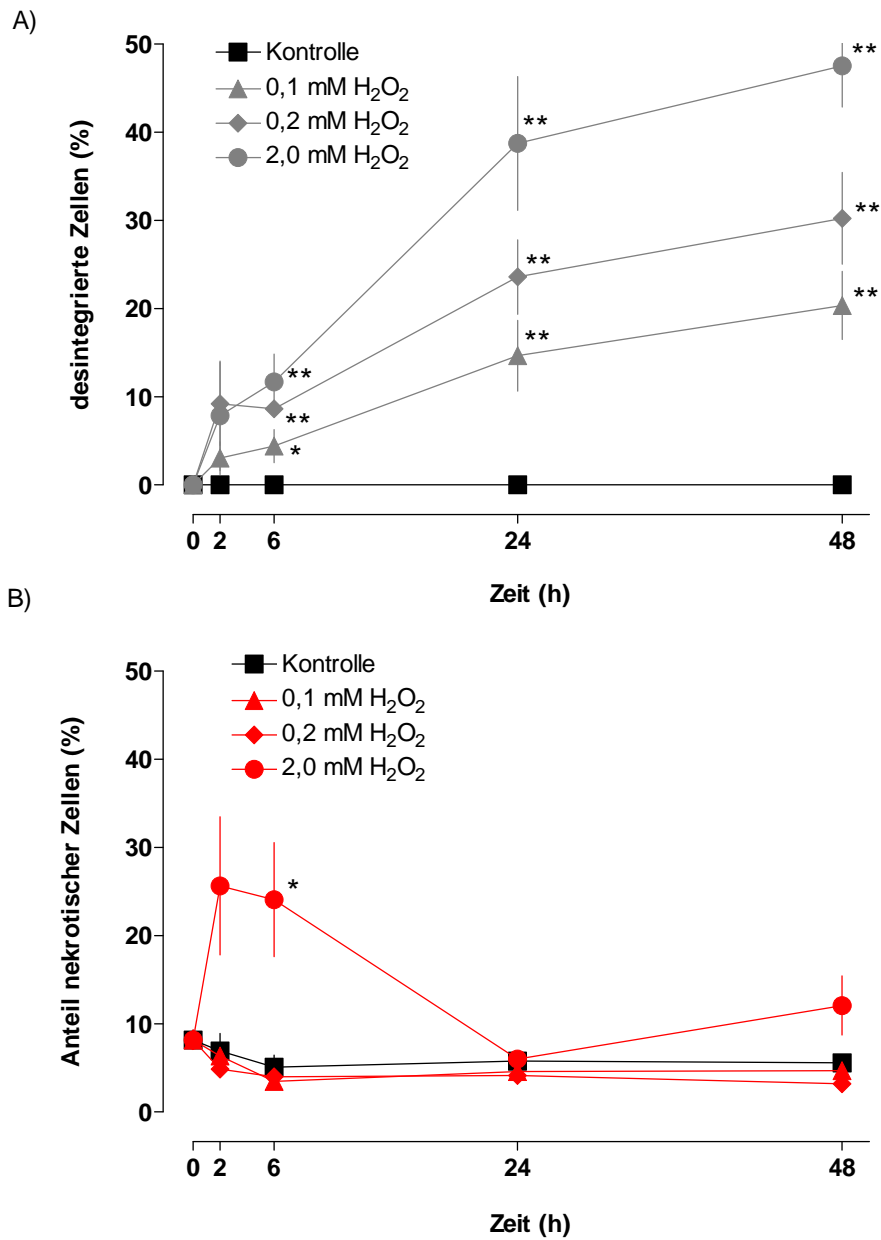


Abbildung 3.13: **Zeitabhängige Wirkungen von Wasserstoffperoxid**

Dargestellt sind die Prozentsätze der desintegrierten Zellen (A) und der nekrotischen Zellen (B) bezogen auf die Gesamtpopulation über eine Expositionszeit von 48 h. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ Experimenten; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit den jeweiligen Kontrollen.

3 Ergebnisse

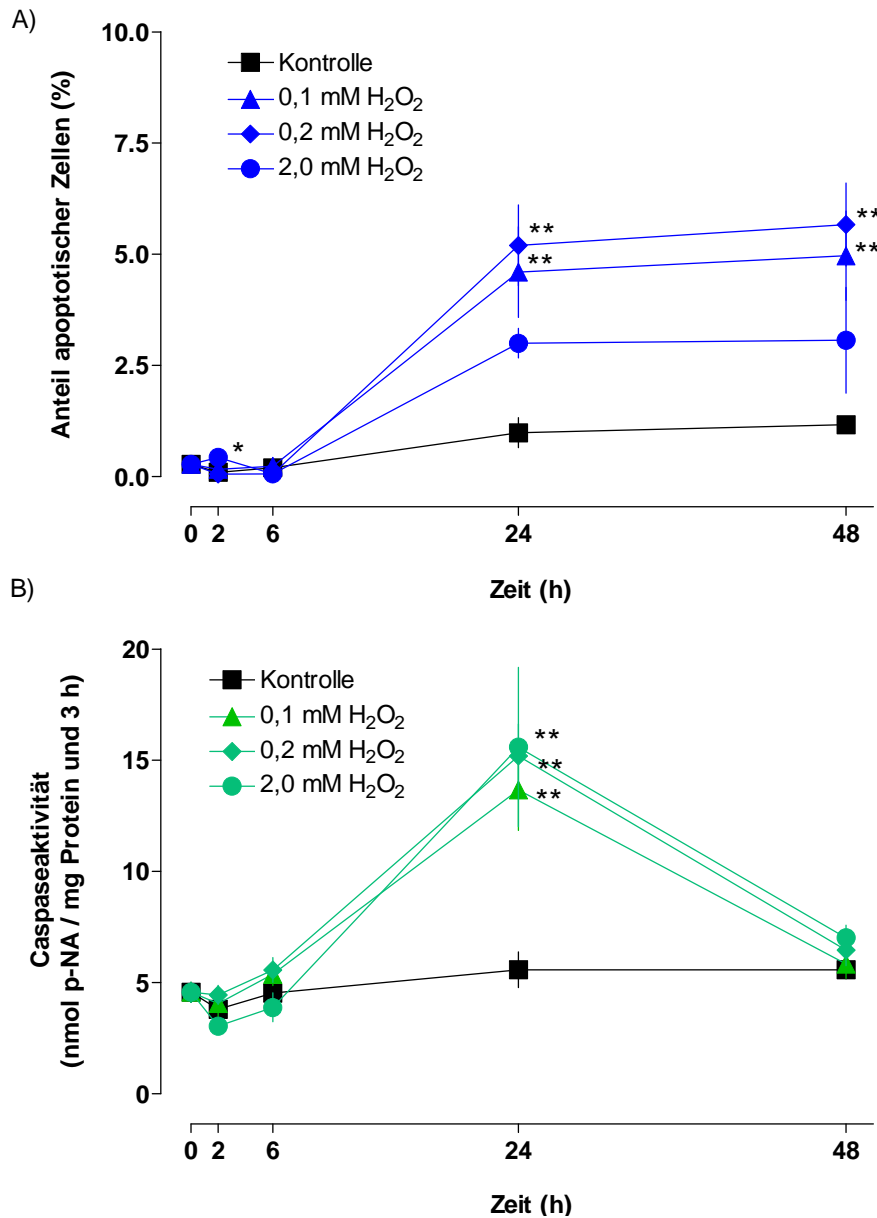


Abbildung 3.14: **Zeitabhängige Wirkungen von Wasserstoffperoxid auf den apoptotischen Zelltod**

Gezeigt sind die Prozentsätze apoptotischer Zellen (A) bezogen auf die Gesamtpopulation über eine Expositionszeit von 48 h und der zeitliche Verlauf der Caspase-3 (B). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ Experimenten; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit den jeweiligen Kontrollen.

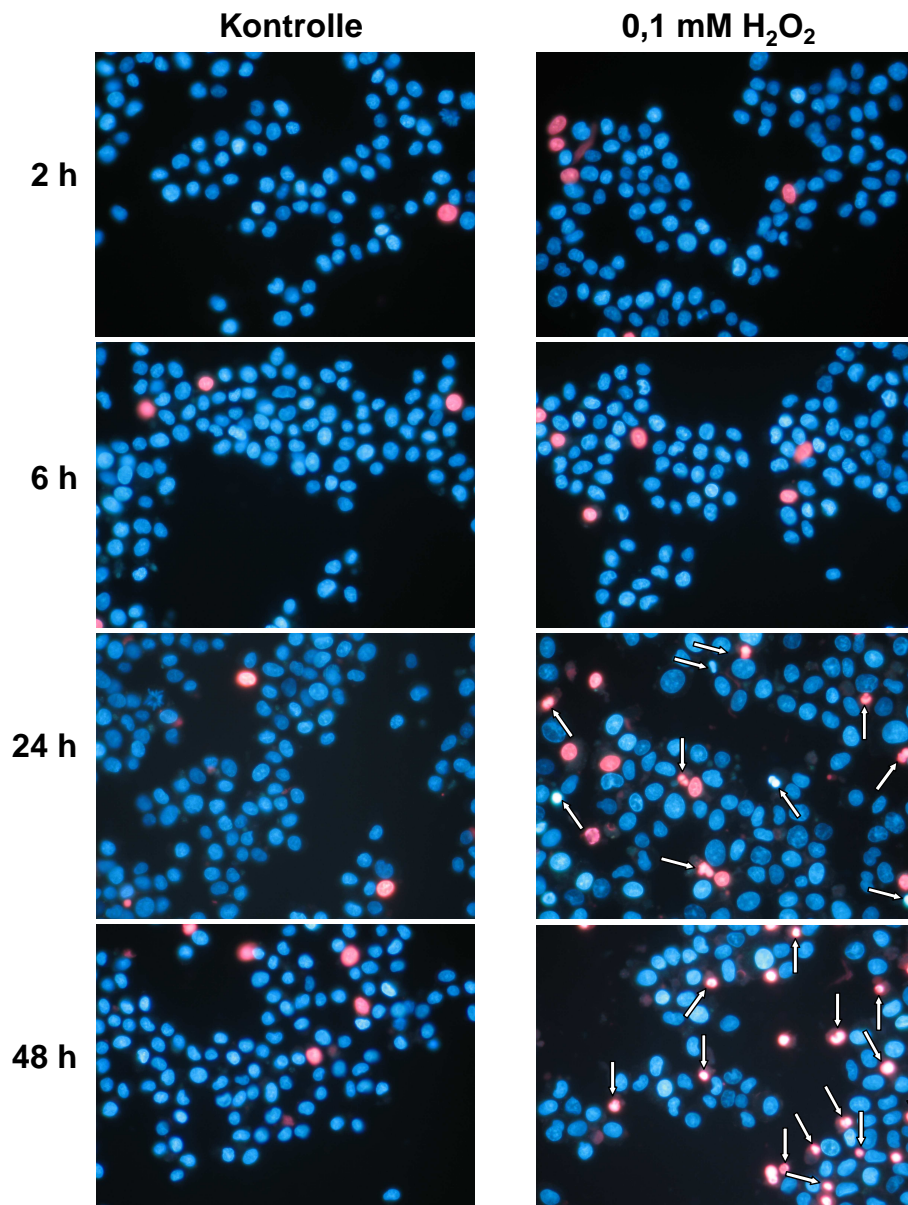


Abbildung 3.15: **Kernfärbung nach Wasserstoffperoxid-Exposition**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit Propidiumjodid und Hoechst 33342 angefärbter C6-Zellkerne. In der linken Spalte befinden sich Aufnahmen der jeweiligen Kontrollen, in der rechten Spalte Aufnahmen von Zellen, die mit 0,1 mM H₂O₂ über 48 h exponiert wurden. Die weißen Pfeile indizieren apoptotische oder spätapoptotische Kerne.

3.3.4 Untersuchung des durch organische Peroxide ausgelösten Zelltods

3.3.4.1 Konzentrationsabhängige Wirkungen der organischen Peroxide

Zur Untersuchung der konzentrationsabhängigen Wirkungen organischer Peroxide auf den Zelltod von C6-Zellen wurde das unter 2.5.2.1 beschriebene Versuchsprotokoll verwendet. Die Zellen wurden über 24 h mit dem Peroxid in den Konzentrationen von 0,01 mM bis 0,2 mM inkubiert.

Die Abbildungen 3.16 und 3.17 zeigen, welcher Zelltod in Abhängigkeit von der CHP- bzw. tert-BuOOH-Konzentration ausgelöst wird. Die Zelltodrate war durch niedrige Konzentrationen (0,01 und 0,02 mM) der organischen Peroxide, CHP und tert-BuOOH, im Vergleich zur Kontrolle unter den gewählten Bedingungen nicht erhöht. Dies änderte sich beim Einsatz von 0,05 mM CHP. Hier zeigte sich nach einer Inkubationszeit von 24 h ein signifikanter Anstieg nekrotischer Zellen von 27,9 % und desintegrierter Zellen von 50,4 %. Zelltod durch Apoptose wurde in dieser und auch in niedrigeren CHP-Konzentrationen nicht bzw. kaum ausgelöst. Dies wurde durch die Messung der Caspase-3-Aktivität bestätigt. Es war keine Aktivitätsteigerung im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Bei 0,05 mM CHP lag die Caspase-3-Aktivität bereits unterhalb des Kontrollniveaus und fiel bei 0,1 mM bis auf Null ab. Ein ähnlicher Kurvenverlauf zeigte sich bei tert-BuOOH (vgl. Abb. 3.17). Im Gegensatz zu CHP traten die zytotoxischen Wirkungen von tert-BuOOH, kenntlich am Anstieg der Kurven für die desintegrierten und nekrotischen Zellen, bei einer Konzentration von 0,1 mM auf. Dabei erhöhte sich die Anzahl desintegrierter Zellen signifikant auf 67,9 %. Die Anzahl nekrotischer Zellen lag bei dieser Konzentration bei 31,7 %. Nach der Exposition mit 0,05 mM tert-BuOOH über 24 h zeigten die Versuche zur Konzentrationsabhängigkeit einen kleinen, aber signifikanten Anstieg im prozentualen Anteil apoptotischer Zellen. Dieser war von einem ebenfalls signifikanten Anstieg der Caspase-3 bei 0,05 mM begleitet.

In der Hauptsache handelte es sich aber beim Zelltod, der durch organische Peroxide ausgelöst wird, um Nekrose.

3 Ergebnisse

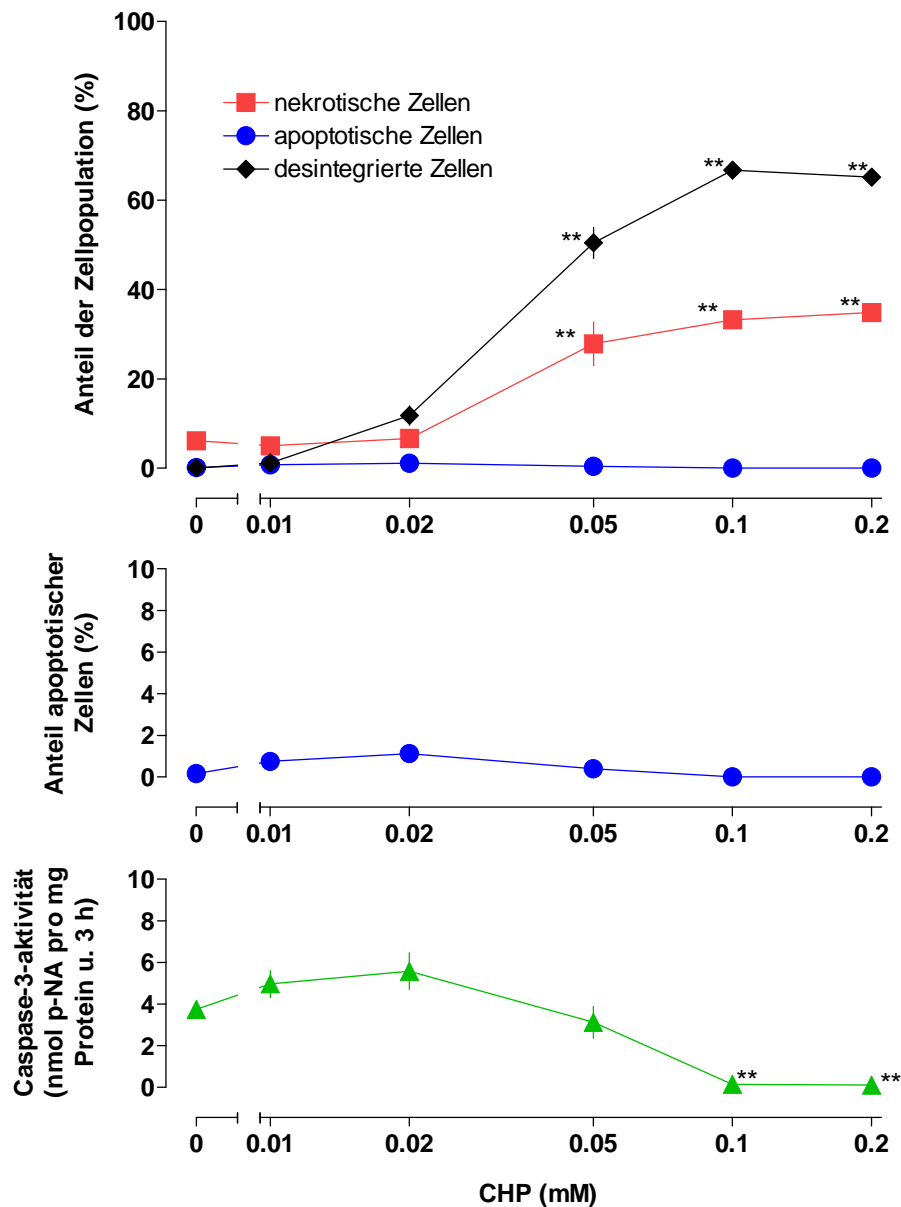


Abbildung 3.16: **Konzentrationsabhängigkeit der zytoletalen Wirkung von CHP auf wachstumsgehemmte C6-Zellen**

Gezeigt sind die Wirkungen verschiedener CHP-Konzentrationen auf wachstumsgehemmte C6-Zellen nach 24 h. Die prozentualen Anteile apoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen sind auf die Gesamtpopulation bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ Experimenten; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit den jeweiligen Kontrollen.

3 Ergebnisse

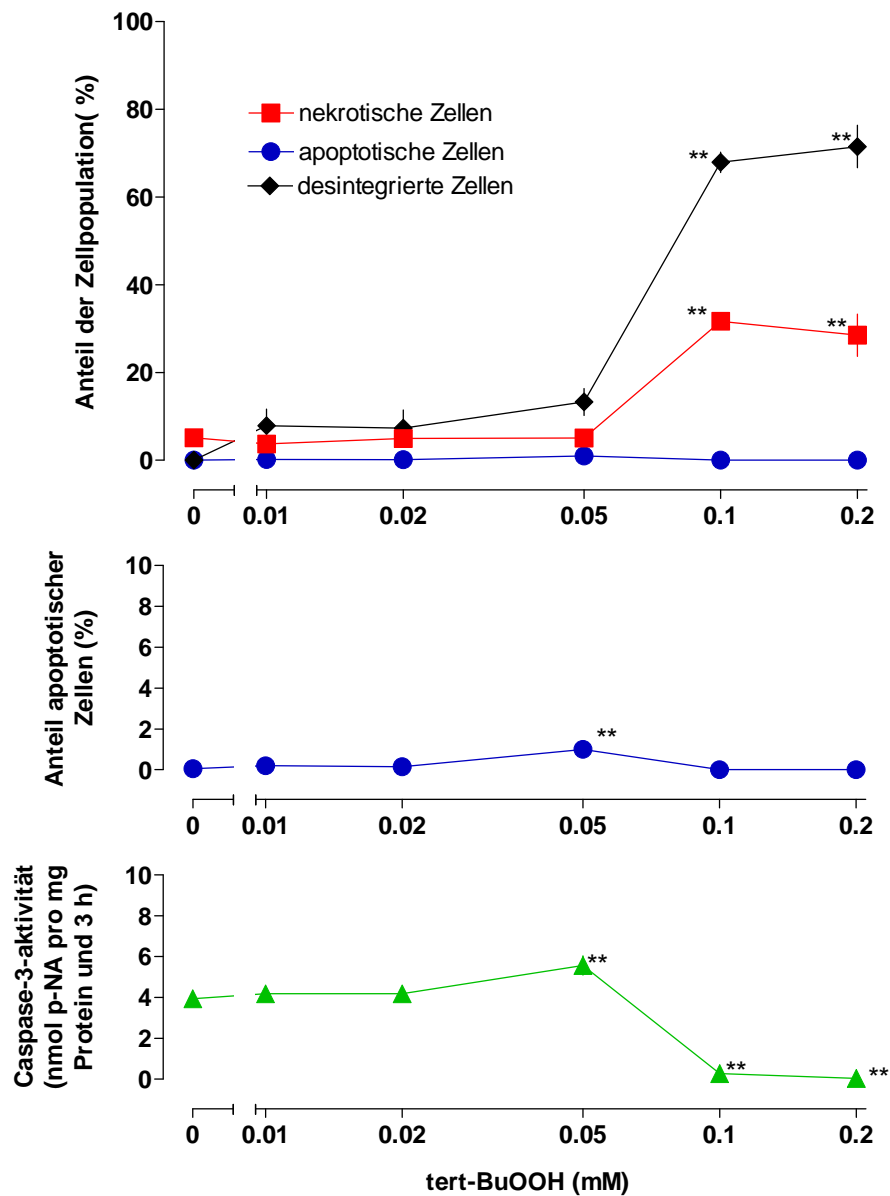


Abbildung 3.17: **Konzentrationsabhängigkeit der zytoletalen Wirkung von tert-BuOOH auf wachstumsgehemmte C6-Zellen**

Gezeigt sind die Wirkungen verschiedener tert-BuOOH-Konzentrationen auf wachstumsgehemmte C6-Zellen nach 24 h. Die prozentualen Anteile apoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen sind auf die Gesamtpopulation bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n=3$ Experimenten; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit den jeweiligen Kontrollen.

3 Ergebnisse

Auch bei CHP und tert-BuOOH wurde überprüft, ob der Proliferationsstatus der C6-Zellen einen Einfluss auf die Art des Zelltods hat. Wie bei H_2O_2 wurden für diese Versuche 100 mm Kulturschalen mit geringerer Zelldichte (500.000 Zellen pro Schale) angelegt. Abbildung 3.18 und Abbildung 3.19 zeigen die Resultate für proliferierende Zellen bei tert-BuOOH- bzw. CHP-Exposition nach 24 h im Konzentrationsbereich von 0,01-0,1 mM.

Bei CHP befanden sich bei 0,02 mM 26 % der Zellen im desintegrierten Zustand. Damit war dieser Anteil größer als bei den nicht proliferierenden Zellen, was wiederum mit der geringeren Aussaatdichte und der damit auch geringeren Zellkonzentration zusammenhängen könnte. Der Anteil desintegrierter Zellen erhöhte sich bei 0,05 mM auf 84 %. Der Anteil nekrotischer Zellen ist bei diesen Konzentrationen nach 24 h nur geringfügig erhöht, was dafür spricht, dass die Nekrose bereits soweit fortgeschritten war, dass ein Großteil der Zellen nach 24 h schon desintegriert war. Bei CHP kam es bei keiner Konzentration zu einem Anstieg apoptotischer Zellen. Auch die Caspaseaktivität blieb bei den niedrigen Konzentrationen auf Kontrollniveau und war bei 0,05 mM nicht mehr meßbar. Bei tert-BuOOH zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei CHP. Bei tert-BuOOH wurde nach 24 h bei 29 % der Zellpopulation Zelltod durch Nekrose festgestellt. Weiterhin waren bereits 35 % der Zellen desintegriert. Im Vergleich zu den proliferationsgehemmten Zellen wurde der Zelltod wie bei H_2O_2 und CHP bei der nächstniedrigeren Konzentration ausgelöst. Ähnlich wie bei CHP wurde bei tert-BuOOH keine erhöhte Zelltodrate durch Apoptose festgestellt. Abschließend lässt sich sagen, dass auch bei den organischen Peroxiden der Proliferationsstatus keinen Einfluss auf die Art des hervorgerufenen Zelltods hat.

3 Ergebnisse

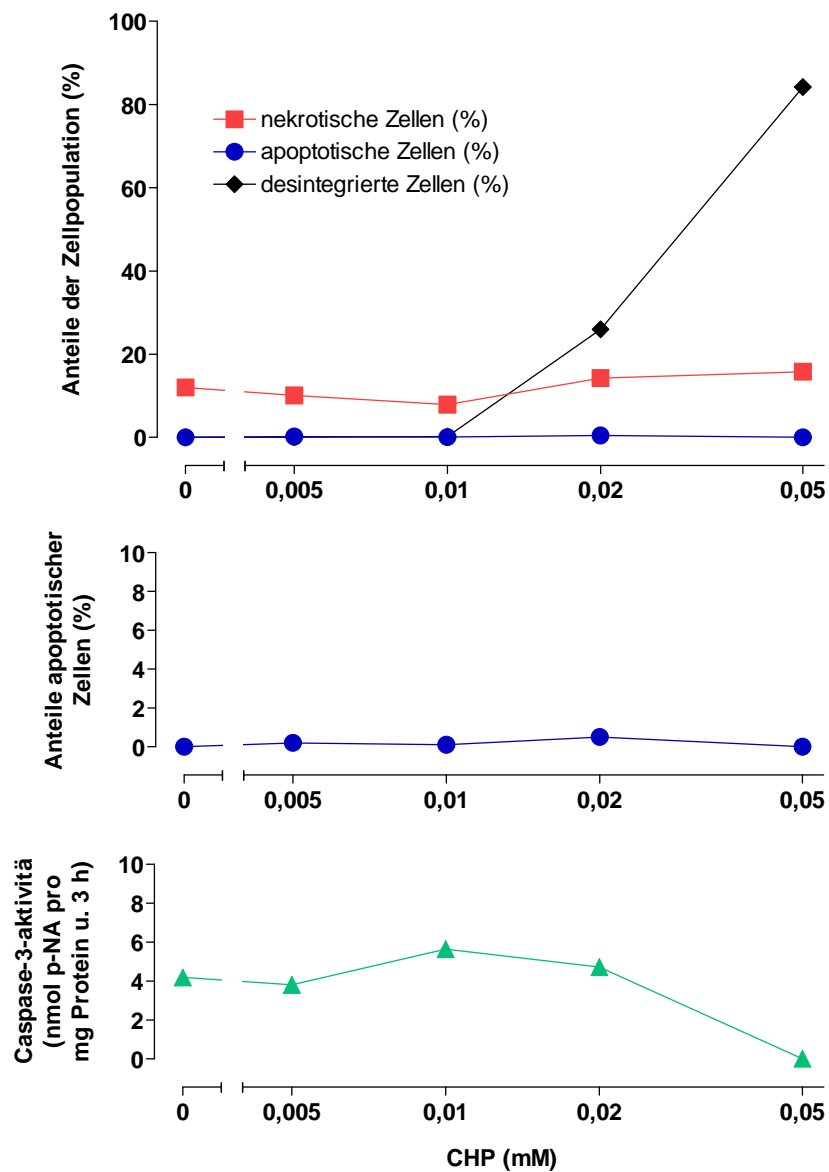


Abbildung 3.18: **Konzentrationsabhängigkeit der zytoletalen Wirkung von CHP auf proliferierende C6-Zellen**

Gezeigt sind die Wirkungen verschiedener CHP-Konzentrationen auf proliferierende C6-Zellen nach 24 h. Die prozentualen Anteile apoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen sind auf die Gesamtpopulation bezogen. Dargestellt ist ein Experiment.

3 Ergebnisse

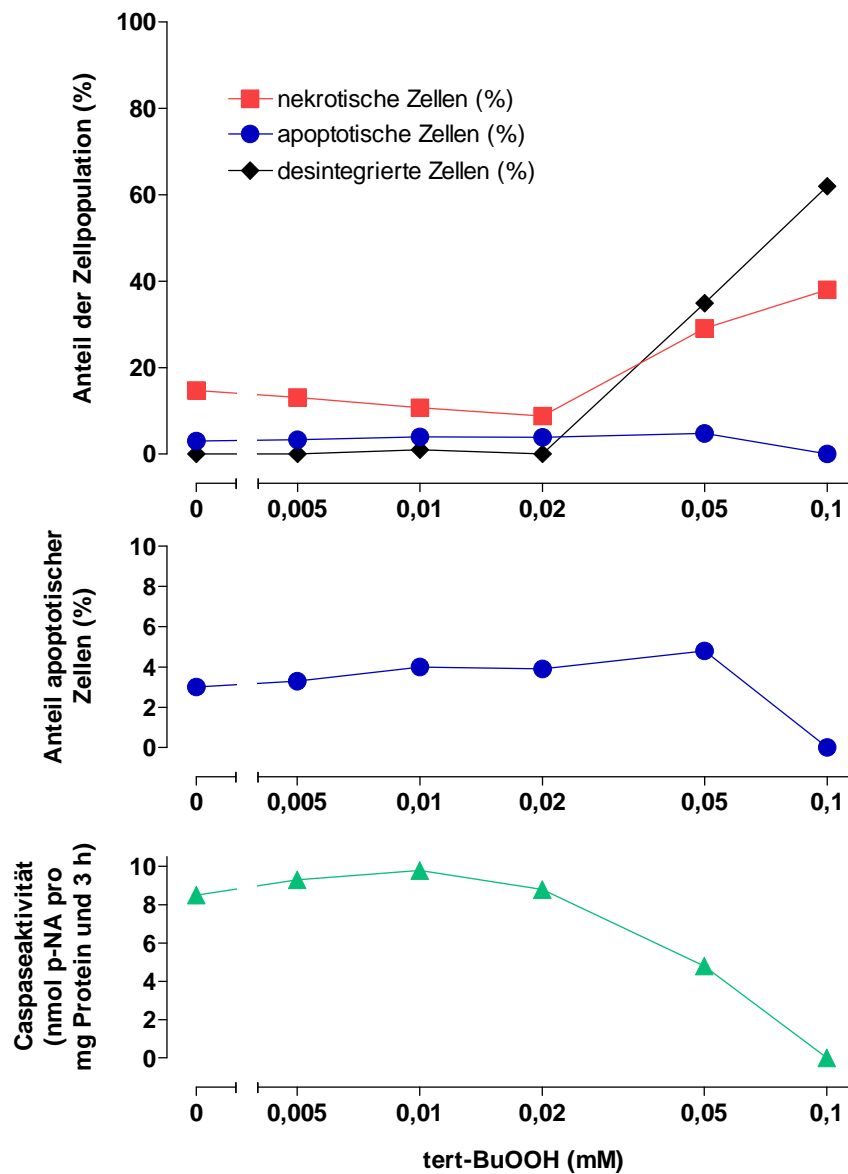


Abbildung 3.19: **Konzentrationsabhängigkeit der zytoletalen Wirkung von *tert*-BuOOH auf proliferierende C6-Zellen**

Gezeigt sind die Wirkungen verschiedener *tert*-BuOOH-Konzentrationen auf proliferierende C6-Zellen nach 24 h. Die prozentualen Anteile apoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen sind auf die Gesamtpopulation bezogen. Dargestellt ist ein Experiment.

3.3.4.2 Zeitabhängige Wirkungen organischer Peroxide

Wie bei Wasserstoffperoxid wurde auch bei den organischen Peroxiden der Einfluss der Expositionszeit auf die Art des Zelltods untersucht. Zu diesem Zweck wurde nach dem unter 2.5.2.1 beschriebenen Versuchsprotokoll verfahren. Die in 100 mm Schalen angelegten Kulturen wurden über 2, 6, 24 und 48 h mit den organischen Peroxiden tert-BuOOH oder CHP in den Konzentrationen 0,01; 0,02; 0,05 und 0,1 mM behandelt.

Bereits nach 2 h verfünffachte sich der prozentuale Anteil nekrotischer Zellen in den mit 0,1 mM tert-BuOOH behandelten Kulturen verglichen mit der Kontrolle. Ein ganz ähnlicher Effekt zeigte sich bei 0,05 und 0,1 mM CHP. Hier stieg der prozentuale Anteil nekrotischer Zellen nach 2 h auf über 30 % an. In den kleineren Konzentrationen, 0,01; 0,02 und 0,05 mM tert-BuOOH und 0,01; 0,02 mM CHP, unterschieden sich die Nekroseraten über den gesamten Expositionszeitraum nicht signifikant von den mitgeführten Kontrollen.

Bei der Exposition mit 0,1 mM tert-BuOOH folgte dem Anstieg nekrotischer Zellen ein stetiger Anstieg desintegrierter Zellen. Nach 2 und 6 h war bei tert-BuOOH der Unterschied zu den Kontrollen noch nicht signifikant, wohl aber nach 24 h. Zu diesem Zeitpunkt waren 62,9 % Zellen desintegriert. Im Unterschied dazu führte 0,1 mM CHP sehr viel schneller zur Desintegration als 0,1 mM tert-BuOOH. Hier war bereits nach 2 h ein sehr viel höherer Anteil der Zellen (62,5 %) desintegriert. Ähnlich verhielten sich die Zellen bei Inkubation mit 0,05 mM CHP. Hier kam es nach 2-stündiger Inkubation ebenfalls zu einem steilen Anstieg desintegrierter Zellen. Dieser Anstieg zeigte sich auch in den niedrigeren Konzentrationen, war aber in seinem Ausmaß sehr viel geringer und auch nicht signifikant gegenüber der Kontrolle. Bei tert-BuOOH führten die Konzentrationen 0,01; 0,02 und 0,05 mM nach der Exposition über 24 und 48 h zu einem schwachen Anstieg im Anteil desintegrierter Zellen. Dieser war jedoch im Vergleich zu den jeweils mitgeführten Kontrollen nicht signifikant.

3 Ergebnisse

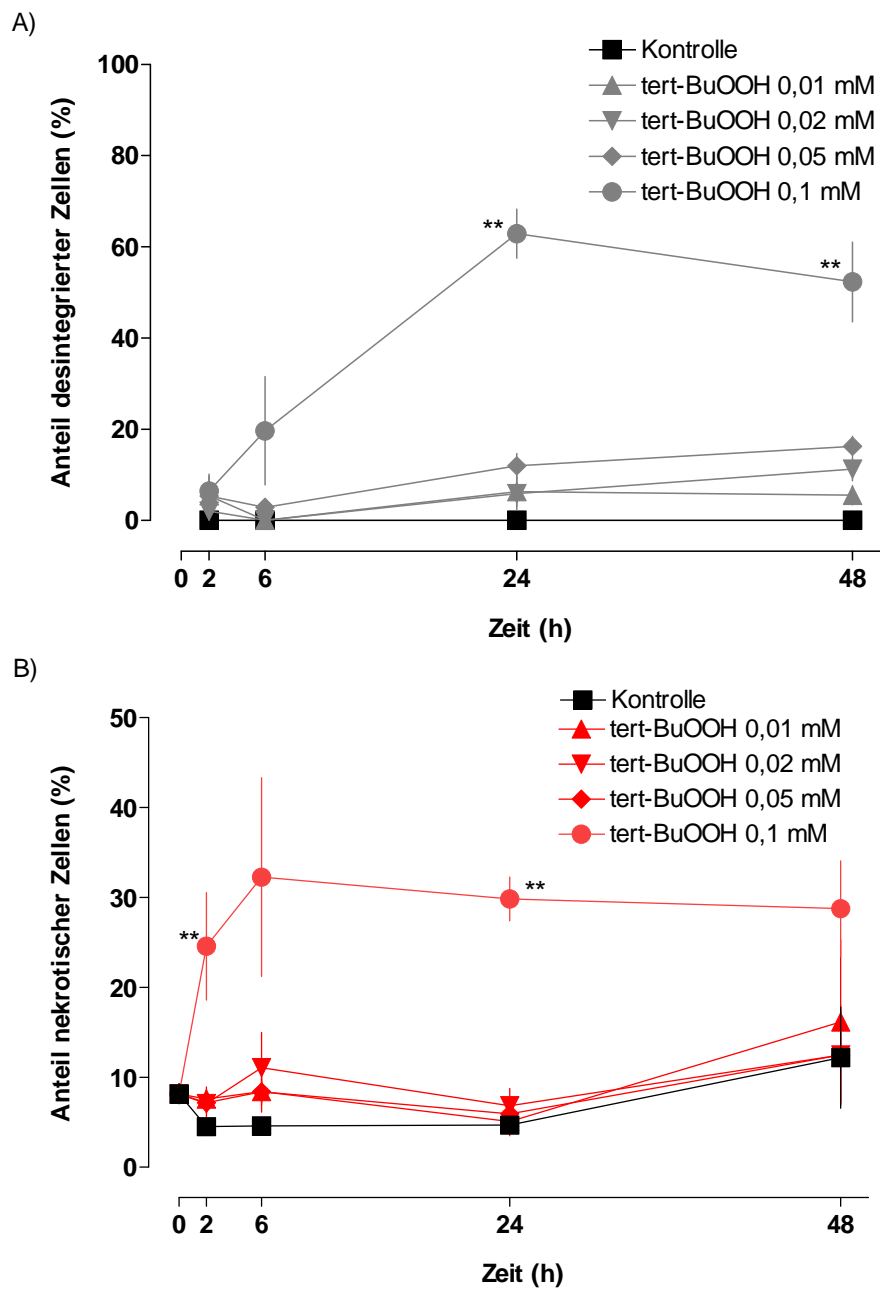


Abbildung 3.20: **Zeitabhängige Wirkungen von tert-BuOOH**

Gezeigt sind die Prozentsätze der desintegrierten Zellen (A) und der nekrotischen Zellen (B) bezogen auf die Gesamtpopulation über eine Expositionszeit von 48 h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ Experimenten; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit den jeweiligen Kontrollen

3 Ergebnisse

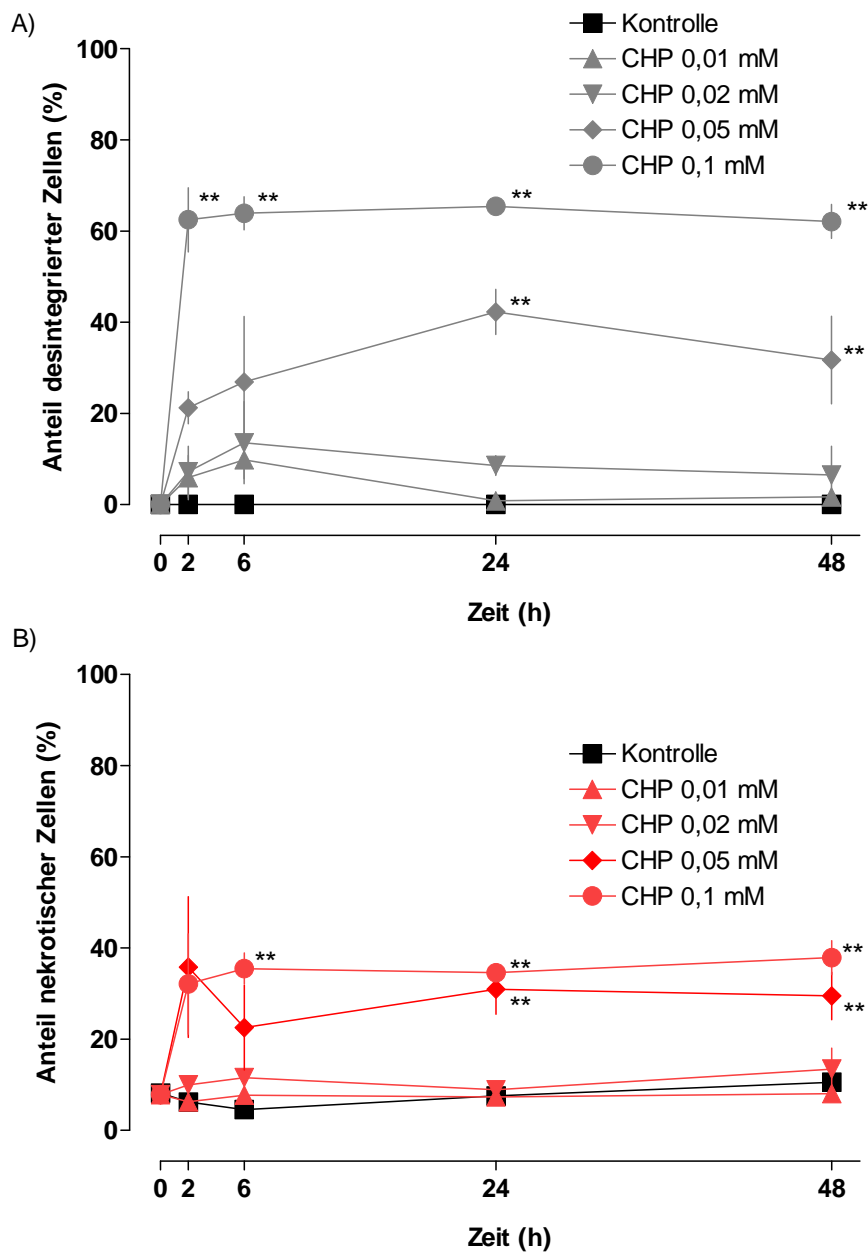


Abbildung 3.21: **Zeitabhängige Wirkungen von CHP**

Gezeigt sind die Prozentsätze der desintegrierten Zellen (A) und der nekrotischen Zellen (B) bezogen auf die Gesamtpopulation über eine Expositionszeit von 48 h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ Experimenten; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit den jeweiligen Kontrollen

3 Ergebnisse

Weiterhin sollte mit den Versuchen zur zeitlichen Abhängigkeit des Zelltods überprüft werden, ob im Verlauf der Exposition mit organischen Peroxiden neben Nekrose auch Zelltod durch Apoptose hervorgerufen werden kann. Dazu wurden wieder die Ergebnisse aus der fluoreszenzmikroskopischen Analyse und der Messung der Caspase-3-Aktivität herangezogen. Wie aus Abb. 3.22 und Abb. 3.23 erkennbar, kam es sowohl bei CHP als auch bei tert-BuOOH zu einem sehr geringen, statistisch nicht signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen nach 24 und 48 h. Passend dazu zeigten die Aktivitätsmessungen der Caspase-3 keine statistisch relevanten Erhöhungen gegenüber der Kontrolle. Im Gegenteil sank in den Konzentrationen, die schon einen ausgeprägten Anteil nekrotischer Zellen aufwiesen, die Caspaseaktivität weit unter das Niveau der Kontrolle ab.

Zusammenfassend haben die zeitabhängigen Expositionsversuche gezeigt, dass C6-Zellen, die mit organischen Peroxiden behandelt wurden, durch Nekrose sterben. Der Anteil der Zellpopulation, der Merkmale eines apoptotischen Zelltods zeigte, war zu keinem Zeitpunkt signifikant erhöht. Der Zelltod durch Nekrose setzte bei CHP wesentlich schneller ein als bei tert-BuOOH, da bereits nach 24 h ein Großteil der Zellpopulation desintegriert war.

3 Ergebnisse

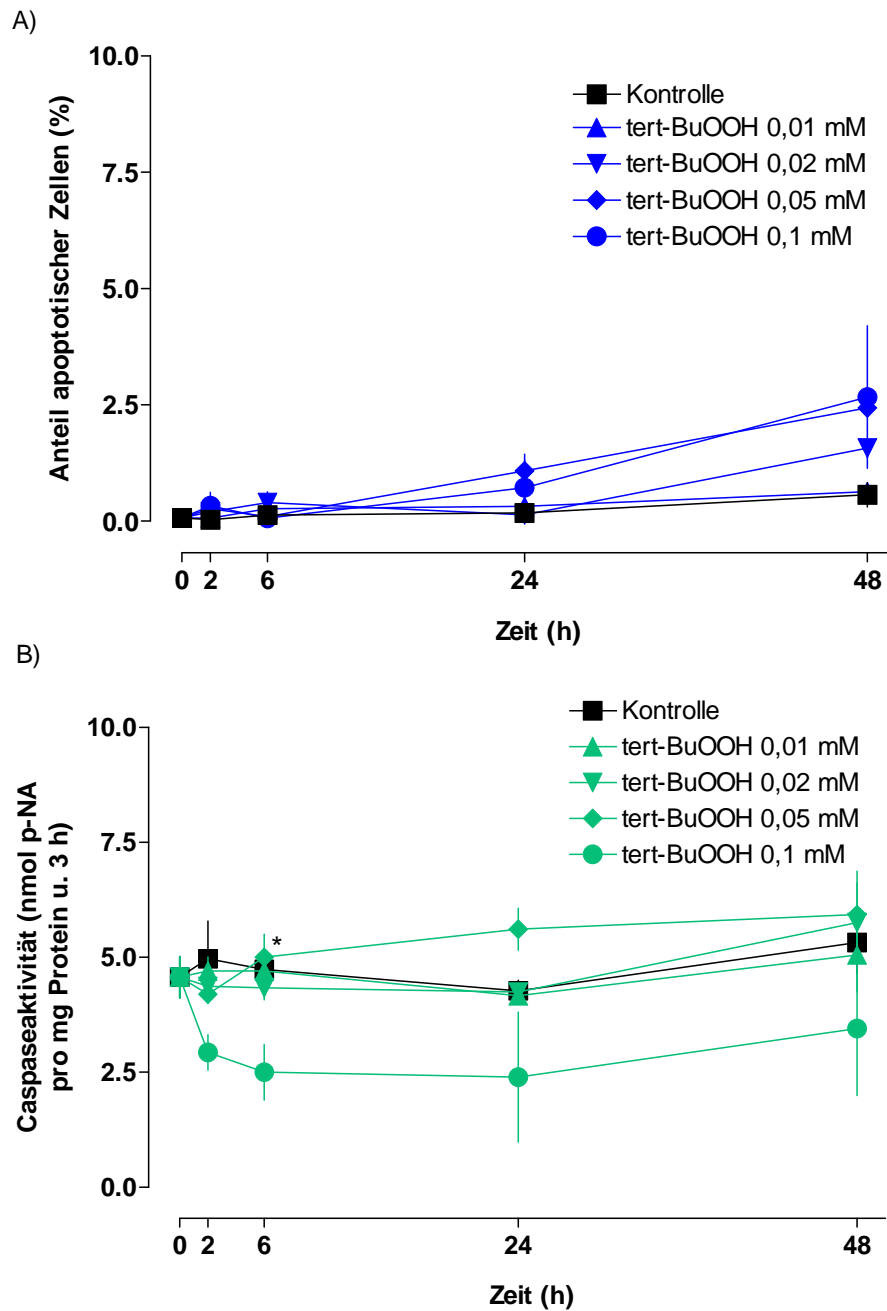


Abbildung 3.22: **Zeitabhängige Wirkungen von tert-BuOOH auf den apoptotischen Zelltod**

Gezeigt sind die Prozentsätze apoptotischer Zellen (A) bezogen auf die Gesamtpopulation über eine Expositionszeit von 48 h und der zeitliche Verlauf der Caspase-3 (B). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ Experimenten; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit den jeweiligen Kontrollen.

3 Ergebnisse

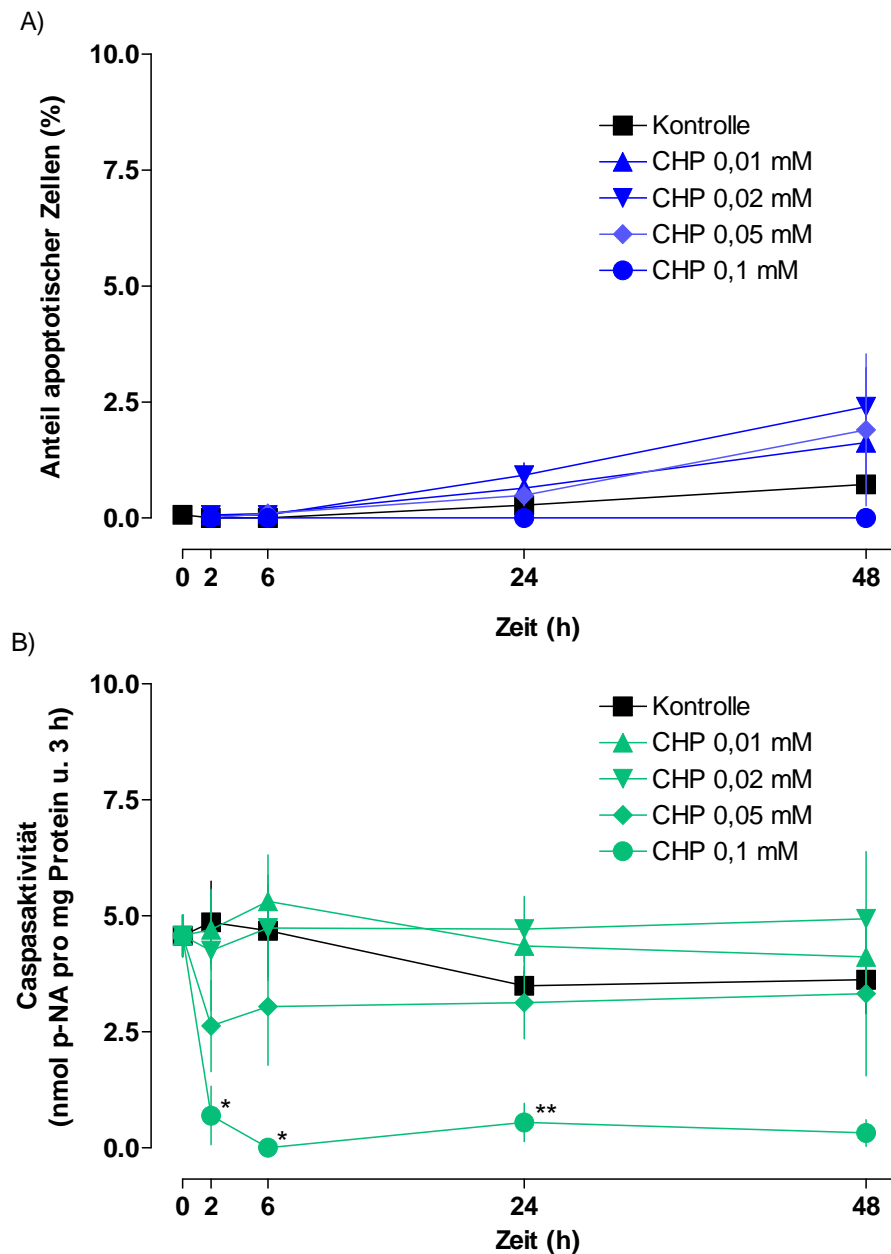


Abbildung 3.23: **Zeitabhängige Wirkungen von CHP auf den apoptotischen Zelltod**

Gezeigt sind die Prozentsätze apoptotischer Zellen (A) bezogen auf die Gesamtpopulation über eine Expositionszeit von 48 h und der zeitliche Verlauf der Caspase-3 (B). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ Experimenten; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit den jeweiligen Kontrollen.

3.4 Einfluss von Antioxidantien auf den Peroxid-induzierten Zelltod

In dem nachfolgenden Abschnitt wird die Wirkung der Antioxidantien, Quercetin und α -Tocopherol, auf den Peroxid-induzierten Zelltod beschrieben. Zu diesem Zweck wurden C6-Zellen mit einer definierten Peroxidkonzentration in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des entsprechenden Antioxidans exponiert.

Die Zellen wurden, wie schon bei den Peroxidversuchen beschrieben, in 100 mm Schalen ausgesät. Für die Versuche wurden die angelegten Kulturen mit einer Peroxidkonzentration behandelt, die sich in den Versuchen zur Konzentrationsabhängigkeit des Peroxid-induzierten Zelltods nach 24 h als zytotoxisch erwiesen hatte. Als zytotoxische Konzentration wurden 20 mM Wasserstoffperoxid und bei den organischen Peroxiden jeweils 0,1 mM eingesetzt. Bei den Versuchen mit Quercetin wurden die Zellen mit Peroxid und Polyphenol zusammen behandelt. Bei den Versuchen mit α -Tocopherol wurden die Zellen 24 h vor dem eigentlichen Versuchsbeginn mit α -Tocopherol vorinkubiert, anschließend gewaschen und dann über 24 h mit dem Peroxid behandelt. Pro Versuch wurden 3 Kontrollen mitgeführt. Die erste Kontrolle bestand aus unbehandelten C6-Zellen in FCS-freiem Medium. Die C6-Zellen der zweiten Kontrolle wurden mit der höchsten eingesetzten Konzentration des Antioxidans (50 μ M) inkubiert. Die Zellen der dritten Kontrolle wurden allein mit der zytotoxisch wirkenden Peroxidkonzentration behandelt. Nach 24 h wurde die Caspase-3-Aktivität bestimmt und die Kerne der C6-Zellen im Hinblick auf die Art des Zelltods fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

3.4.1 Einfluss von Quercetin auf den Peroxid-induzierten Zelltod

Abbildung 3.24 zeigt die Ergebnisse von Versuchen, in denen geprüft wurde, ob Quercetin selbst zytotoxisch wirkt. Dazu wurden die Zellen für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen des Polyphenols inkubiert.

3 Ergebnisse

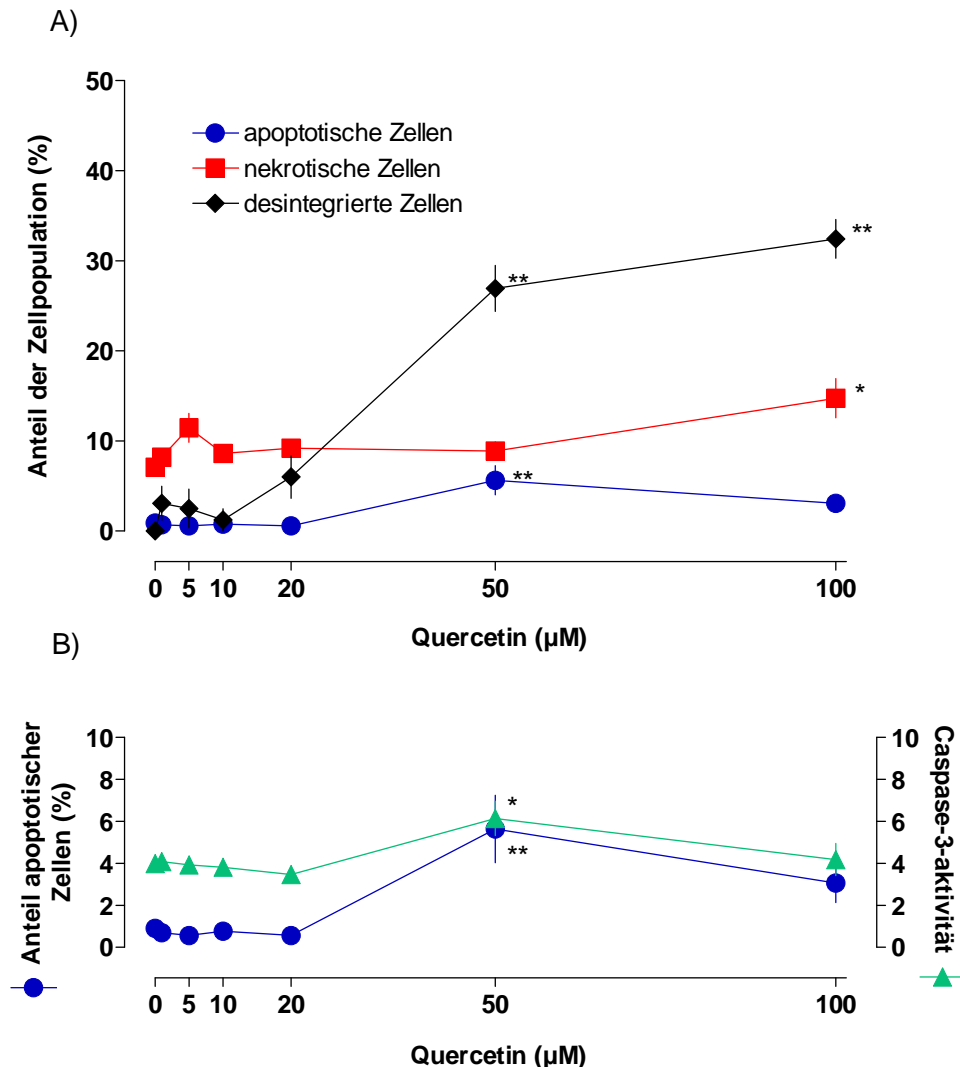


Abbildung 3.24: **Induktion von Apoptose und Nekrose durch Quercetin**

C6-Zellen wurden über 24 h mit den Quercetin-Konzentrationen 1-100 μM inkubiert. Abbildung A zeigt die prozentualen Anteile apoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen zur Gesamtpopulation. In Abbildung B sind vergrößert die Anteile apoptotischer Zellen zusammen mit der Caspase-3-Aktivität (nmol p-NA/mg Protein u. 3 h) dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=3$ Experimenten; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit den jeweiligen Kontrollen.

3 Ergebnisse

Quercetin-Konzentrationen von 1 bis 20 μM zeigten keine zytotoxischen Wirkungen, wohl aber 50 und 100 μM . Bei 50 μM war sowohl der Anteil apoptotischer als auch desintegrierter Zellen zur unbehandelten Kontrolle signifikant erhöht, während sich kein Anstieg des Anteils nekrotischer Zellen erkennen ließ. Im Mittel waren 6 % der Zellen morphologisch apoptotisch, was mit einem Anstieg der Caspase-3-Aktivität um 50 % einherging. Bei 100 μM waren 50 % der Zellen tot, 15 % davon nekrotisch und 32 % bereits desintegriert. Ein geringerer Teil als bei 50 μM Quercetin ist durch Apoptose zu Grunde gegangen. Somit wirkt Quercetin in Konzentrationen von 50 und 100 μM selbst zytotoxisch, die Zellen sterben sowohl durch Apoptose als auch durch Nekrose.

Inkubiert man C6-Zellen unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen mit einer nach 24 h zu 100 % zytotoxisch wirkenden Peroxidkonzentration in Kombination mit Quercetin, so gelangt man bei Wasserstoffperoxid zu dem in Abbildung 3.25 gezeigten Ergebnis. Die Zellen wurden über 24 h mit 20 mM Wasserstoffperoxid in Gegenwart ansteigender Quercetin-Konzentrationen inkubiert. Wasserstoffperoxid löste in einer Konzentration von 20 mM nach 24 h zu fast 100 % Zelltod aus, wobei in den Versuchen 55 % der Gesamtpopulation desintegriert waren und 42 % Merkmale des nekrotischen Zelltods zeigten. In Kombination mit 50 μM Quercetin wurde der Anteil desintegrierter und nekrotischer Zellen signifikant im Vergleich zu den Zellen, die mit Wasserstoffperoxid allein inkubiert wurden, gesenkt. In Gegenwart von 50 μM Quercetin sank der Prozentsatz toter Zellen auf 54 %. Gleichzeitig kam es in Kombination mit 50 μM Quercetin zu einem signifikanten Anstieg der Caspase-3-Aktivität. Der Anteil apoptotischer Zellen war geringfügig, jedoch nicht signifikant erhöht. Die niedrigeren Quercetin-Konzentrationen zeigten bei der Exposition mit 20 mM Wasserstoffperoxid keine protektive Wirkung. Zwar sank der prozentuale Anteil nekrotischer und desintegrierter Zellen in Kombination mit 20 μM Quercetin, doch war der Abfall erst bei 50 μM signifikant.

In gleicher Weise wurden Versuche mit den organischen Peroxiden, CHP und tert-BuOOH, durchgeführt. Als zytotoxische Peroxidkonzentration, die in nahezu 100 % der Zellen zum Zelltod führte, wurden 100 μM des Peroxids eingesetzt. Abbildung 3.26 zeigt die Wirkungen von Quercetin bei gleichzeitiger Exposition mit 100 μM CHP. Aus der Abbildung wird deutlich, dass Quercetin C6-Zellen vor der

3 Ergebnisse

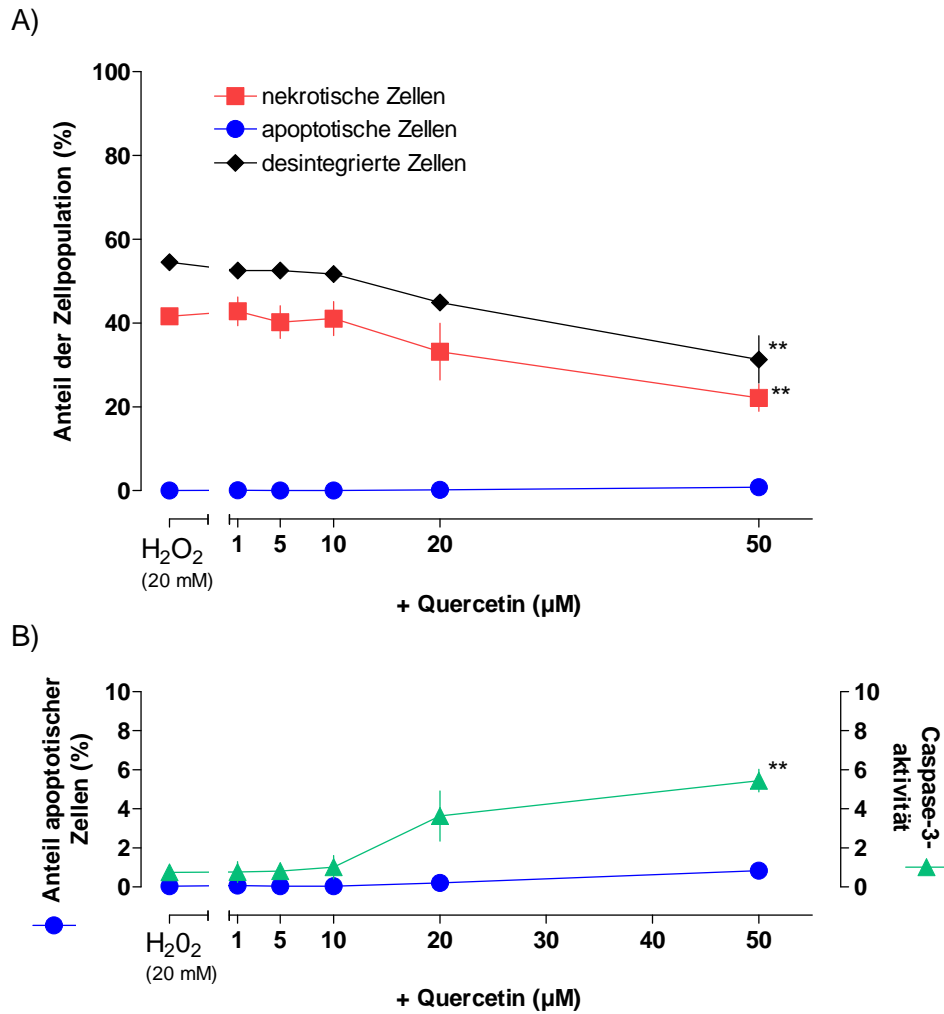


Abbildung 3.25: **Einfluss von Quercetin auf die zytotoxische Wirkung von Wasserstoffperoxid**

Die C6-Zellen wurden mit 20 mM H₂O₂ in Gegenwart verschiedener Quercetin-Konzentrationen über 24 h inkubiert. Im linken Teil der X-Achse sind die Wirkungen von 20 mM H₂O₂ allein gezeigt, im rechten Teil in Kombination mit dem Antioxidans in aufsteigenden Konzentrationen. Abbildung A zeigt die prozentualen Anteile apoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation. In Abbildung B sind vergrößert die Anteile apoptotischer Zellen zusammen mit der Caspase-3-Aktivität (nmol p-NA/mg Protein u. 3 h) dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=3 Experimenten; *p < 0,05; **p < 0,01 verglichen mit den mit 20 mM H₂O₂ behandelten Zellen.

3 Ergebnisse

zytotoxischen Wirkung von CHP schützt. Beginnend ab 5 μM (signifikant ab 10 μM) sinkt der Anteil nekrotischer und desintegrierter Zellen deutlich ab. In diesen Versuchen zeigte 10 μM Quercetin die stärkste zytoprotektive Wirkung. Bei dieser Konzentration starben im Mittel 10,8 % der Zellen. Bei 20 μM hingegen stieg der Anteil desintegrierter Zellen wieder an, so dass die Zelltodrate als Summe aus desintegrierten, nekrotischen und apoptotischen Zellen 25 % betrug und sich im Vergleich zu 10 μM Quercetin verdoppelt hatte. Bei 50 μM wurden die zytoletalen Wirkungen des Quercetins noch stärker sichtbar, der Anteil desintegrierter Zellen stieg weiter an. Insgesamt waren bei dieser Quercetin-Konzentration 50 % der Zellen tot. Die Aktivität der Caspase-3 begann in Kombination mit 5 μM Quercetin zu steigen. Ein signifikanter Unterschied zu den Zellen, die ausschließlich mit 100 μM CHP behandelt wurden, ergab sich in Kombination mit 20 μM Quercetin. Der Anteil apoptotischer Zellen stieg im Vergleich zur Kontrolle mit 100 μM CHP ab 10 μM Quercetin geringfügig an.

Quercetin in Kombination mit 100 μM des organischen Peroxids tert-BuOOH zeigte eine ähnliche Wirkung auf die Zellen wie in Kombination mit CHP. Tert-BuOOH in einer Konzentration von 100 μM führte nach 24 h in nahezu 100 % der Zellen zum Zelltod. In den Versuchen waren im Mittel 32,6 % der Zellen nekrotisch und 67,2 % desintegriert. Wie aus Abbildung 3.27 hervorgeht, wirkt Quercetin auch bei Exposition mit tert-BuOOH zytoprotektiv. Die stärkste zytoprotektive Wirkung wurde bei 10 μM Quercetin beobachtet. Der Prozentsatz nekrotischer Zellen sank bei dieser Quercetin-Konzentration auf 13,7 % ab, der Prozentsatz desintegrierter Zellen auf 16,4 %. Im Vergleich zur Kontrolle (100 μM tert-BuOOH) stieg der Anteil apoptotischer Zellen bei 10 μM Quercetin geringfügig, jedoch signifikant an. Einhergehend mit dem Anstieg apoptotischer Zellen nahm auch die Caspase-3-Aktivität bei den Konzentrationen 10, 20 und 50 μM signifikant zu. In Kombination mit 50 μM Quercetin nahm der Prozentsatz toter Zellen bedingt durch die zytotoxische Wirkung von Quercetin in höheren Konzentration (vgl. Abbildung 3.24) wieder zu (55 %).

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zu den Versuchen mit Quercetin und zytotoxischen Peroxidkonzentrationen sind in Abbildung 3.28 gezeigt. Die zytoprotektive Wirkung von Quercetin wird anhand von Aufnahmen von Kernen Peroxid behandelter

3 Ergebnisse

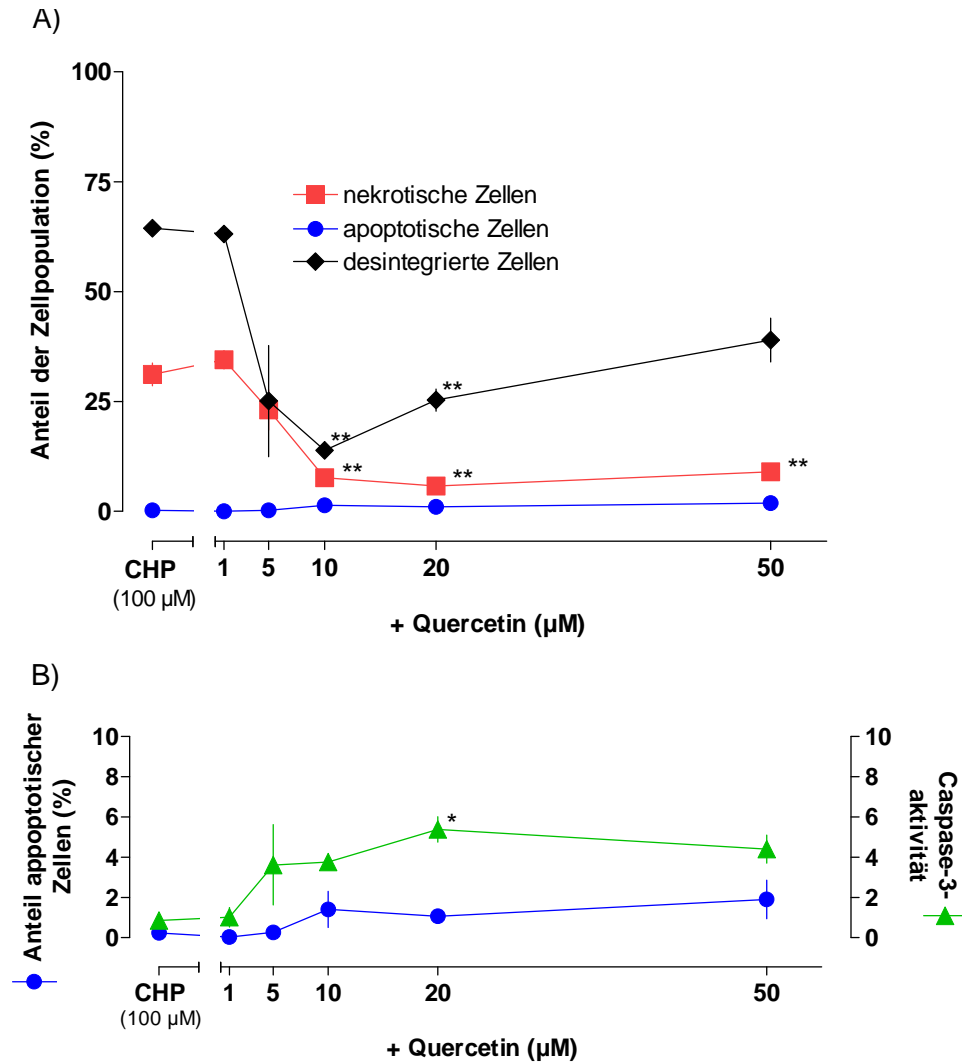


Abbildung 3.26: **Einfluss von Quercetin auf die zytotoxische Wirkung von CHP**

Die C6-Zellen wurden mit 100 μ M CHP in Gegenwart verschiedener Quercetin-Konzentrationen über 24 h inkubiert. Im linken Teil der X-Achse sind die Wirkungen von 100 μ M CHP allein gezeigt, im rechten Teil in Kombination mit dem Antioxidans in aufsteigenden Konzentrationen. Abbildung A zeigt die prozentualen Anteile apoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation. In Abbildung B sind vergrößert die Anteile apoptotischer Zellen zusammen mit der Caspase-3-Aktivität (nmol p-NA/mg Protein u. 3 h) dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=3 Experimenten; *p < 0,05; **p < 0,01 verglichen mit den mit 100 μ M CHP behandelten Zellen.

3 Ergebnisse

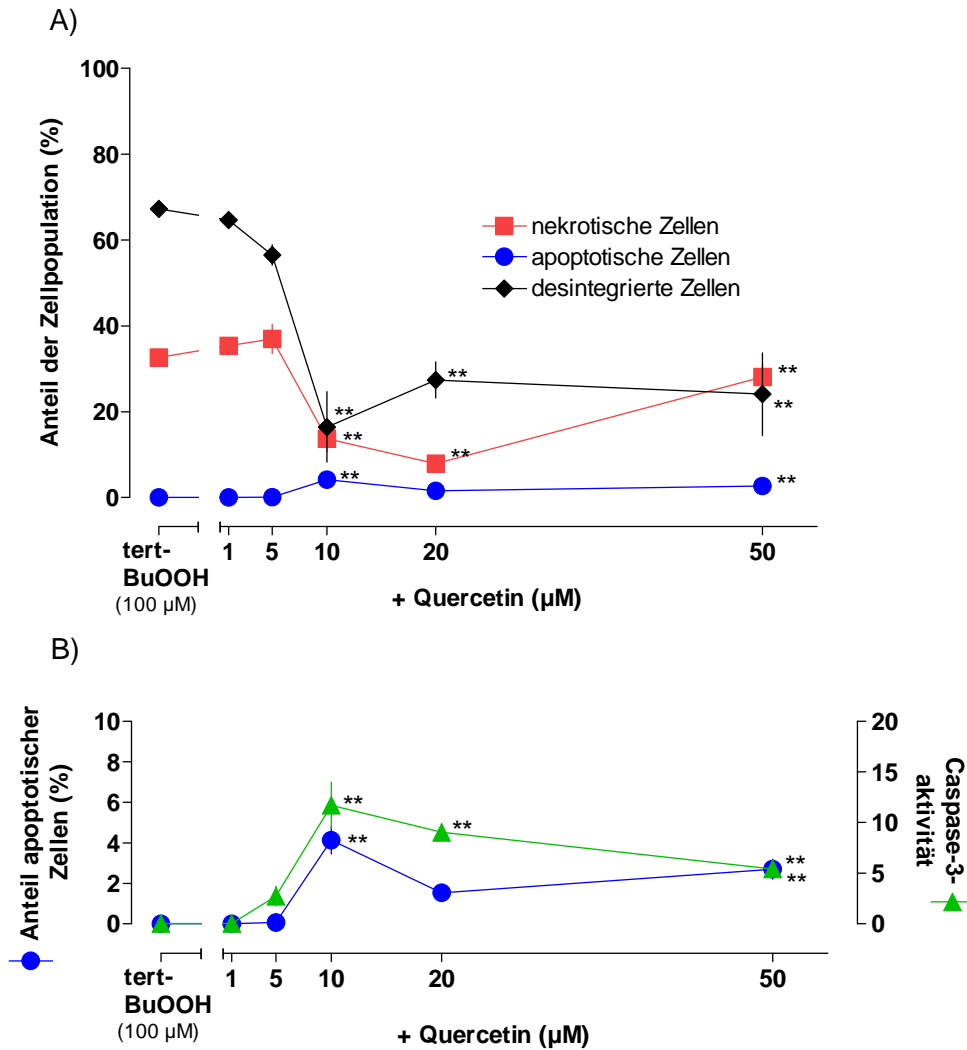


Abbildung 3.27: **Einfluss von Quercetin auf die zytotoxische Wirkung von tert-BuOOH**

Die C6-Zellen wurden mit 100 μ M tert-BuOOH in Gegenwart verschiedener Quercetin-Konzentrationen über 24 h inkubiert. Im linken Teil der X-Achse sind die Wirkungen von 100 μ M tert-BuOOH allein gezeigt, im rechten Teil in Kombination mit dem Antioxidans in aufsteigenden Konzentrationen. Abbildung A zeigt die prozentualen Anteile apoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation. In Abbildung B sind vergrößert die Anteile apoptotischer Zellen zusammen mit der Caspase-3-Aktivität (nmol p-NA/mg Protein u. 3 h) dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ Experimenten; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit den mit 100 μ M tert-BuOOH behandelten Zellen.

3 Ergebnisse

Zellen in An- und Abwesenheit von Quercetin veranschaulicht. In der mittleren Bilderreihe sind die Zellkerne unbehandelter Kontrollen gezeigt. Die darüber liegenden Aufnahmen zeigen Kerne aus Kulturen von C6-Zellen, die über 24 h mit einer zytotoxischen Peroxidkonzentration behandelt worden sind. Die Zellkerne zeigen durchweg morphologische Merkmale der Nekrose. Die schwachrote Färbung der Kerne in diesen Versuchen ist vermutlich auf eine Oxidation des Fluoreszenzfarbstoffs Propidiumjodid zurückzuführen. Die unterhalb der Kontrollen befindlichen Aufnahmen zeigen Kerne von C6-Zellen, die mit einer zytotoxischen Peroxidkonzentration in Gegenwart der am stärksten zytoprotektiv wirkenden Quercetin-Konzentration behandelt worden sind. Die Kerne dieser Zellen sind zu einem überwiegenden Anteil durch Hoechst 33342 blau gefärbt und zeigen die typischen Merkmale von Zellkernen lebender Zellen. Nur ein kleiner Anteil der Zellen ist nekrotisch. Wie in den Ergebnissen zu den Versuchen mit Quercetin und Wasserstoffperoxid bereits dargestellt und zusätzlich aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erkennbar, ist die Anzahl nekrotischer Zellen bei den Versuchen mit Wasserstoffperoxid höher als bei den Versuchen mit den organischen Peroxiden und Quercetin.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Quercetin C6-Zellen vor dem Peroxid-induzierten Zelltod schützen kann, obwohl es in Abwesenheit von Peroxiden in bestimmten Konzentrationen selbst zytotoxisch wirkt. Die Zellen sterben dabei sowohl durch Nekrose als auch durch Apoptose. Die zytoprotektive Wirkung von Quercetin zeigt sich deutlicher bei den organischen Peroxiden als bei Wasserstoffperoxid, kenntlich durch einen höheren Anteil vitaler Zellen. Der zytoprotektive Effekt von Quercetin ist bei Zellen, die mit den strukturell unterschiedlichen organischen Peroxiden CHP und tert-BuOOH behandelt wurden, vergleichbar. Quercetin in einer Konzentration von 10 μM zeigte sowohl bei CHP als auch bei tert-BuOOH den stärksten protektiven Effekt, während Zellen, die mit Wasserstoffperoxid behandelt wurden, am effektivsten mit 50 μM Quercetin geschützt wurden. Die Art und Weise des tert-BuOOH induzierten Zelltods, der in den mit 100 μM tert-BuOOH behandelten Kulturen in der Hauptsache durch Nekrose bestimmt ist, wird durch Quercetin dahingehend beeinflusst, dass in der Zellpopulation zu einem zwar geringen, wohl aber signifikant größeren Anteil Zelltod auch durch Apoptose ausgelöst

3 Ergebnisse

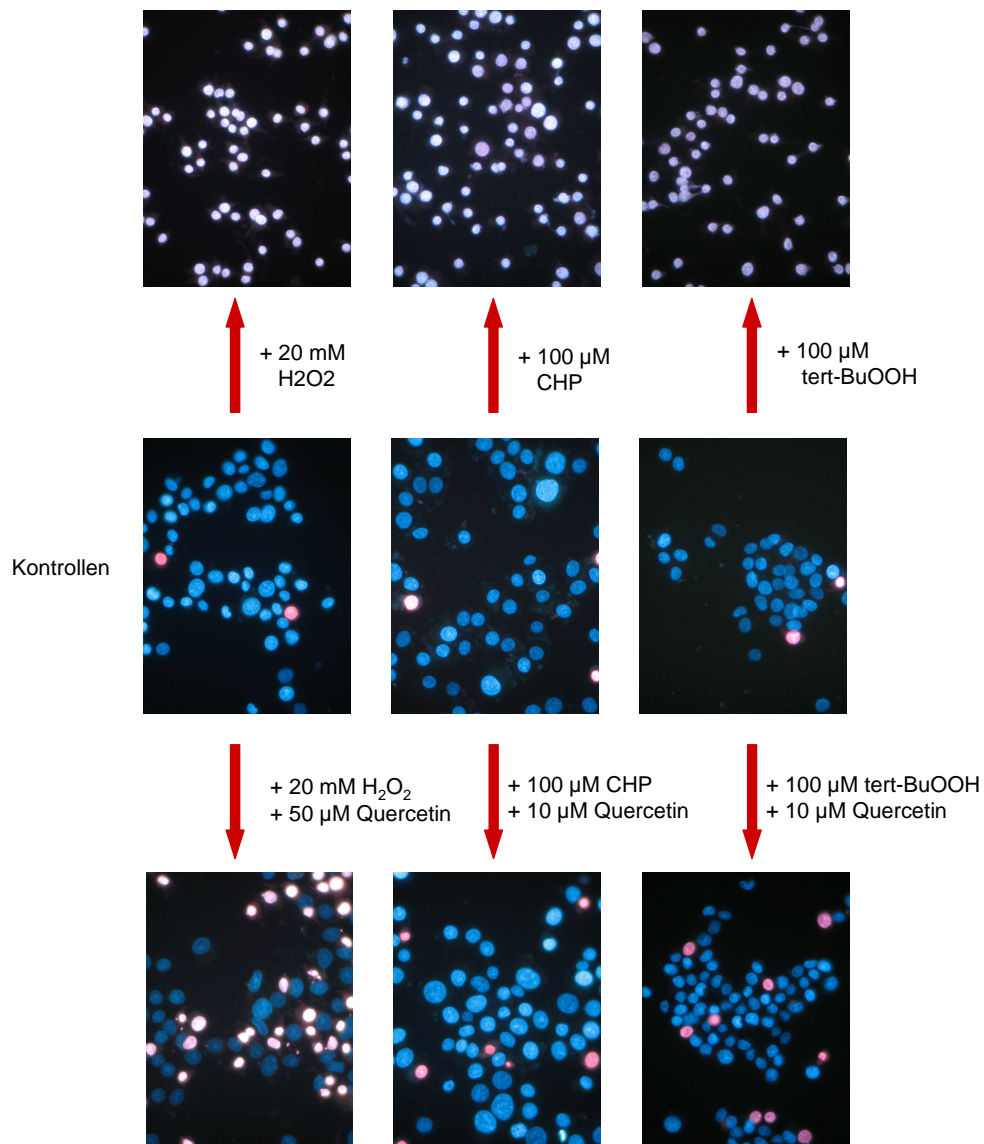


Abbildung 3.28: **Zytoprotektive Wirkung von Quercetin**

Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von C6-Zellkernen nach Anfärbung mit Hoechst 33342 und Propidiumjodid. In der mittleren Bilderreihe sind die Zellkerne unbehandelter Kontrollen gezeigt. Darüberliegende Aufnahmen zeigen Kerne von C6-Zellen, die über 24 h mit einer zytotoxischen Peroxidkonzentration behandelt worden sind. Die unterhalb der Kontrollen befindlichen Aufnahmen zeigen Kerne von C6-Zellen, die mit einer zytotoxischen Peroxidkonzentration in Gegenwart von Quercetin behandelt worden sind. Die Aufnahmen erfolgten bei 400 facher Vergrößerung mit dem Zeiss Fluoreszenzmikroskop.

3 Ergebnisse

wird.

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, wie Quercetin in Gegenwart geringer, Apoptose-induzierender H_2O_2 -Konzentrationen auf C6-Zellen wirkt. Zu diesem Zweck wurden die C6-Zellen über 24 h mit H_2O_2 -Konzentrationen von 50 μM bis 1 mM in Gegenwart von 50 μM Quercetin behandelt. In Abbildung 3.29 zeigt sich folgendes Ergebnis. Im Vergleich zu den Wirkungen, die von 50 μM Quercetin allein hervorgerufen wurden, kam es durch die Kombination mit geringen H_2O_2 -Konzentrationen weder zu einem Anstieg noch zu einem Abfall im prozentualen Anteil apoptotischer Zellen. Ebenso kam es bei keiner Konzentration zu einem Anstieg der Caspase-3-Aktivität. Der Anteil der nekrotischen Zellen stieg bei den höheren Peroxidkonzentrationen 200-1000 μM leicht an, unterschied sich aber nicht signifikant zu den mit 50 μM Quercetin allein behandelten Zellen. Vergleicht man die Zelltod-induzierende Wirkung geringer H_2O_2 -Konzentrationen mit den Wirkungen in Kombination mit 50 μM Quercetin, so ist der prozentuale Anteil toter Zellen bei der Kombination mit 50 μM Quercetin größer. Die toxischen Wirkungen geringer H_2O_2 -Konzentrationen werden also in Anwesenheit von 50 μM Quercetin nicht vermindert. Oder andersherum, die zytoprotektive Wirkung Quercetin kommt nur in höheren H_2O_2 -Konzentrationen zum Tragen.

In Abbildung 3.30 werden die Wirkungen ansteigender Quercetin-Konzentrationen (5-50 μM) bei Exposition mit einer zytoletalen Peroxidkonzentration in unterschiedlichen Kulturbedingungen gegenübergestellt. Bei den Versuchen mit 96-Well-Kulturen wurde als zytotoxische Peroxidkonzentration 100 μM CHP bzw. 500 μM H_2O_2 gewählt. Für die Kulturen in 100 mm Schalen wurden die zytoletalen Konzentrationen 100 μM CHP und 20 mM H_2O_2 verwendet. Die Kurvenverläufe zeigen, dass mit zunehmender Quercetin-Konzentration der Anteil vitaler Zellen sowohl bei Exposition mit CHP als auch bei Exposition mit H_2O_2 zunimmt. Darüber hinaus sind die Kurvenverläufe in 96-Well-Kulturen und den 100 mm Schalen für das jeweilige Peroxid nahezu identisch. Somit sind die protektiven Wirkungen von Quercetin von den Kulturbedingungen unabhängig. Desweiteren scheinen die unterschiedlichen Zellkonzentrationen in den dargestellten Kulturbedingungen keinen Einfluss auf die protektiven Wirkungen von Quercetin zu haben.

3 Ergebnisse

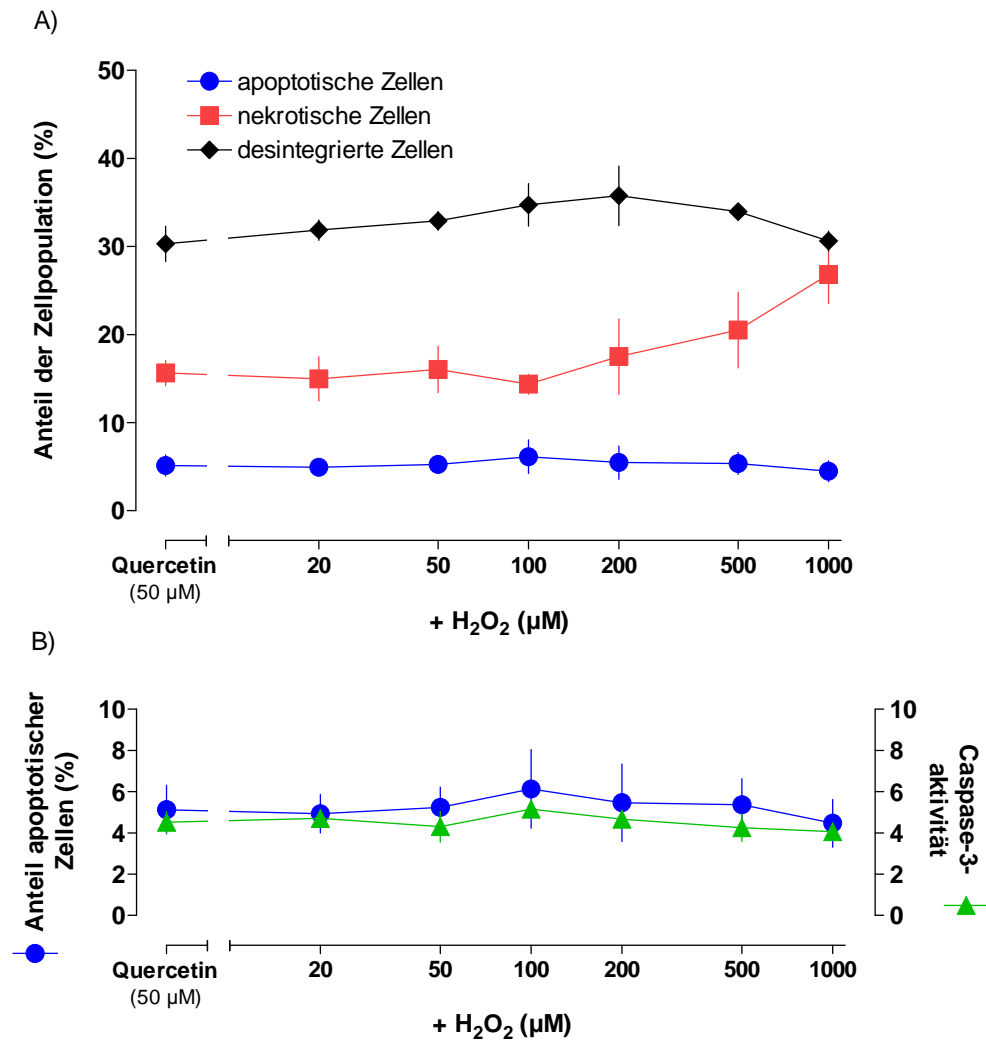


Abbildung 3.29: **Einfluss von Quercetin auf H₂O₂ induzierte Apoptose**

Die C6-Zellen wurden mit verschiedenen, kleinen H₂O₂-Konzentrationen in Gegenwart von 50 μM Quercetin über 24 h inkubiert. Im linken Teil der X-Achse sind die Wirkungen von 50 μM Quercetin allein gezeigt, im rechten Teil in Kombination mit aufsteigenden H₂O₂-Konzentrationen. Abbildung A zeigt die prozentualen Anteile apoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation. In Abbildung B sind vergrößert die Anteile apoptotischer Zellen zusammen mit der Caspase-3-Aktivität (nmol p-NA/mg Protein u. 3 h) dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von n = 3 Experimenten; *p < 0,05; **p < 0,01 verglichen mit den mit 50 μM Quercetin behandelten Zellen.

3 Ergebnisse

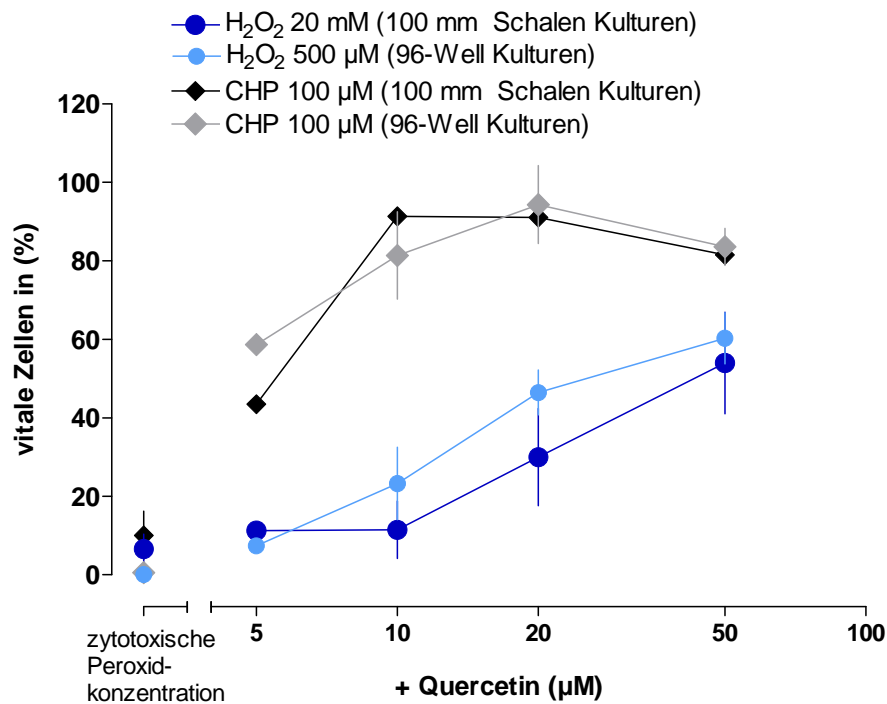


Abbildung 3.30: **Vergleich der Wirkungen von Quercetin bei unterschiedlichen Kulturbedingungen**

Die C6-Zellen wurden über 24 h mit einer zytotoxischen Peroxidkonzentration in Gegenwart aufsteigender Quercetin-Konzentrationen behandelt. Gezeigt sind die Wirkungen von Quercetin in 96-Well-Mikrotiterplatten und 100 mm Kulturschalen. Im linken Teil der X-Achse ist der prozentuale Anteil vitaler Zellen nach Behandlung mit einer zytotoxisch wirkenden Peroxidkonzentration gezeigt, im rechten Teil die Kombination aus zytotoxischer Peroxidkonzentration mit aufsteigenden Quercetin-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ Experimenten.

3.4.2 Einfluss von α -Tocopherol auf den Peroxid-induzierten Zelltod

Um zu prüfen, ob α -Tocopherol die zytotoxische Wirkung von Peroxiden beeinflusst, wurden die Zellen über 24 h mit dieser Substanz vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h in Abwesenheit von α -Tocopherol mit dem jeweiligen Peroxid behandelt. Zur Kontrolle, ob α -Tocopherol selbst zytotoxisch auf C6-Zellen wirkt, wurde bei jedem Versuch eine Kontrolle mit α -Tocopherol vorinkubierten Zellen mitgeführt und analog zu mit Peroxid behandelten Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass α -Tocopherol in der höchsten eingesetzten Konzentration von 50 μ M keine zytotoxischen Wirkungen auf C6-Zellen ausübte. Sowohl der Prozentsatz apoptotischer Zellen als auch der nekrotischer Zellen unterschied sich nicht von der unbehandelten Kontrolle.

Wie aus Abbildung 3.31 deutlich wird, zeigte sich bei der Exposition mit 20 mM H_2O_2 über 24 h durch keine der zur Vorinkubation eingesetzten α -Tocopherol-Konzentrationen eine schützende Wirkung. Der prozentuale Anteil nekrotischer und desintegrierter Zellen veränderte sich im Vergleich zu der allein mit 20 mM H_2O_2 behandelten Kontrolle nicht. Die Zellen starben, wie im Kapitel 3.3.3.1 für diese hohe Peroxidkonzentration beschrieben, ausschließlich durch Nekrose. Zelltod durch Apoptose wurde nicht beobachtet.

Im Gegensatz zu Wasserstoffperoxid wurden die zytotoxischen Wirkungen der organischen Peroxide, CHP und tert-BuOOH, durch die Vorinkubation mit α -Tocopherol vermindert. Wie in Abbildung 3.32 gezeigt, verringerte sich die zytotoxische Potenz von CHP in Abhängigkeit von der bei der Vorinkubation eingesetzten α -Tocopherol-Konzentration. Während die Zelltodrate bei 1 μ M α -Tocopherol noch nahezu 100 % betrug bewirkte die Vorinkubation mit 5 μ M α -Tocopherol eine Reduktion des Anteils toter Zellen um die Hälfte. Der prozentuale Anteil nekrotischer Zellen sank von 34,8 % auf 15,2 %, der Prozentsatz desintegrierter Zellen von 63,2 % auf 34,4 %. Durch die Erhöhung der α -Tocopherol-Konzentration auf 10 μ M sank die Zelltodrate um weitere 10 %. Die Vorinkubation mit 20 und 50 μ M α -Tocopherol führte zu keiner weiteren Steigerung der protektiven Wirkung. Der Anteil nekrotischer und desintegrierter Zellen veränderte sich nicht mehr. Mit der Verringerung des Zelltods durch

3 Ergebnisse

Nekrose erhöhte sich prozentuale Anteil apoptotischer Zellen leicht. Dieser Anstieg ist jedoch lediglich bei 5 μ M mit 1,7 % signifikant. Einhergehend mit dem Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen stieg auch, beginnend ab 5 μ M, die Caspase-3-Aktivität. Die Vorinkubation mit höheren α -Tocopherol-Konzentrationen als 5 μ M bewirkte keine weitere Erhöhung im Anteil apoptotischer Zellen und der Caspase-3-Aktivität. Die Kurven verlaufen ähnlich wie bei den nekrotischen und desintegrierten Zellen in einer Art Sättigung.

Bei der Exposition der mit α -Tocopherol vorinkubierten Zellen mit tert-BuOOH wurde ähnlich wie bei der Exposition mit CHP eine Verminderung der zytotoxischen Potenz des Peroxids beobachtet. Abbildung 3.33 zeigt, dass die schützende Wirkung von α -Tocopherol bereits in einer Konzentration von 1 μ M einsetzt. Der Anteil toter Zellen verminderte sich bei dieser Konzentration auf 33,6 %, bei 5 μ M auf 28 %. Durch Vorinkubation mit höheren α -Tocopherol-Konzentrationen sinken die Prozentsätze nekrotischer und desintegrierter Zellen nur noch geringfügig. Ähnlich wie bei den Versuchen mit CHP wird die protektive Wirkung durch eine weitere Erhöhung der α -Tocopherol-Konzentration nicht mehr gesteigert. Ein maximal möglicher Schutz durch Vorinkubation mit α -Tocopherol ist somit erreicht.

Im Gegenzug zur Verringerung des Zelltods durch Nekrose erhöhte sich bei allen eingesetzten α -Tocopherol-Konzentrationen die Zahl der durch Apoptose zu Grunde gehenden Zellen signifikant gegenüber der mit tert-BuOOH behandelten Kontrolle. Der Anteil apoptotischer Zellen veränderte sich nicht mit zunehmender α -Tocopherol-Konzentration, sondern blieb mit einem etwa zehnprozentigen Anteil an der Gesamtpopulation konstant. Die Zunahme des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen wurde von einem signifikanten Anstieg der Caspase-3-Aktivität begleitet. Die Höhe der Caspaseaktivität ist bei allen eingesetzten α -Tocopherol-Konzentrationen konstant.

3 Ergebnisse

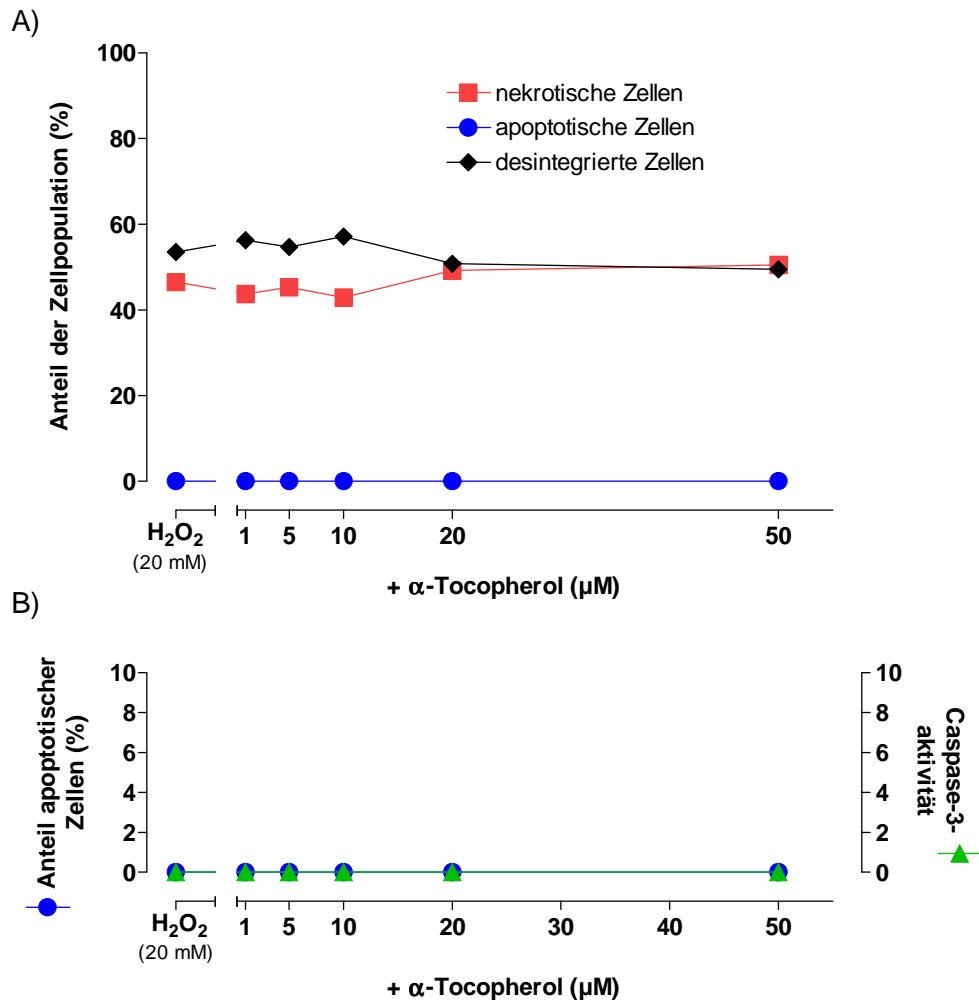


Abbildung 3.31: **Einfluss von α -Tocopherol auf die zytotoxische Wirkung von H_2O_2**

Die C6-Zellen wurden über 24 h mit den α -Tocopherol-Konzentrationen 1, 5, 10, 20 und 50 μ M vorinkubiert und anschließend über weitere 24 h mit 20 mM H_2O_2 behandelt. Im linken Teil der X-Achse sind die Wirkungen von 20 mM H_2O_2 allein gezeigt, im rechten Teil in Kombination mit dem Antioxidans in aufsteigenden Konzentrationen. Abbildung A zeigt die prozentualen Anteile apoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation. In Abbildung B sind vergrößert die Anteile apoptotischer Zellen zusammen mit der Aktivität der Caspase-3 (nmol p-NA/mg Protein u. 3 h) abgebildet. Dargestellt ist ein Experiment.

3 Ergebnisse

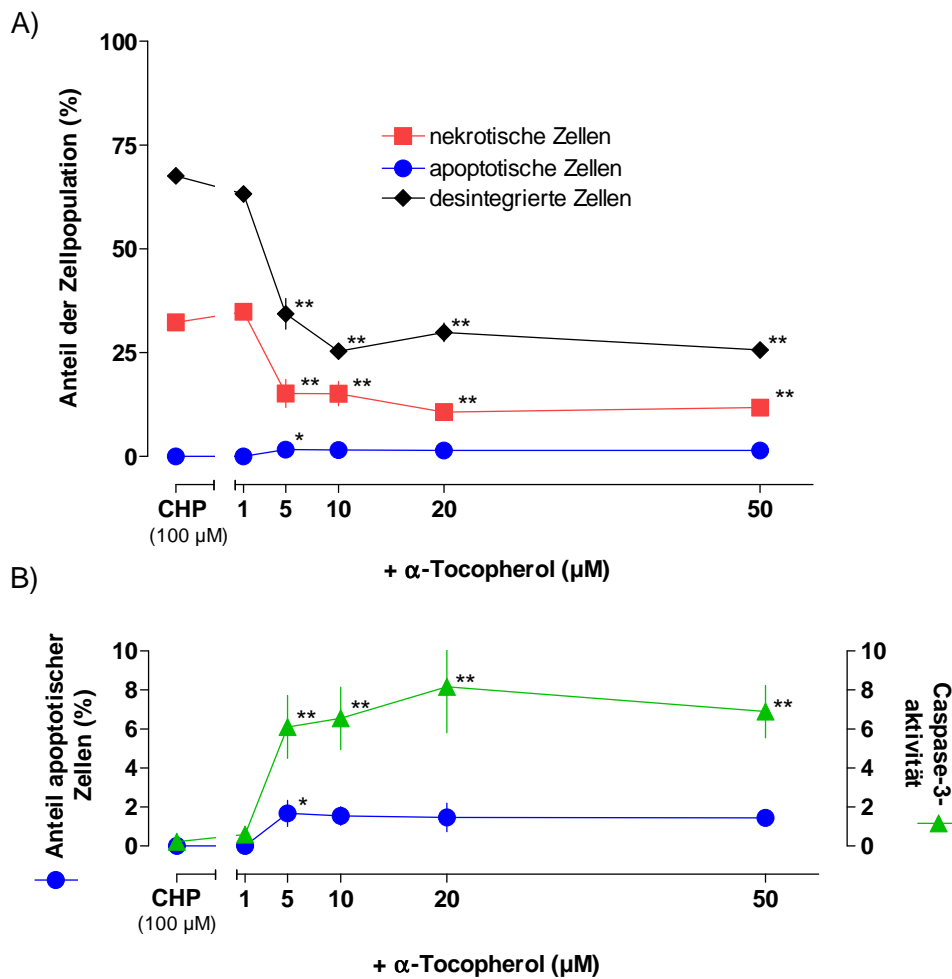


Abbildung 3.32: Einfluss von α -Tocopherol auf die zytotoxische Wirkung von CHP

Die C6-Zellen wurden über 24 h mit den α -Tocopherol-Konzentrationen 1, 5, 10, 20 und 50 μ M vorinkubiert und anschließend über weitere 24 h mit 100 μ M CHP behandelt. Im linken Teil der X-Achse sind die Wirkungen von 100 μ M CHP allein gezeigt, im rechten Teil in Kombination mit dem Antioxidans in aufsteigenden Konzentrationen. Abbildung A zeigt die prozentualen Anteile apoptotischer, neutrotischer und desintegrierter Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation. In Abbildung B sind vergroert die Anteile apoptotischer Zellen zusammen mit der Aktivität der Caspase-3 (nmol p-NA/mg Protein u. 3 h) dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 3 Experimenten; *p < 0,05; **p < 0,01 verglichen mit den jeweiligen Kontrollen.

3 Ergebnisse

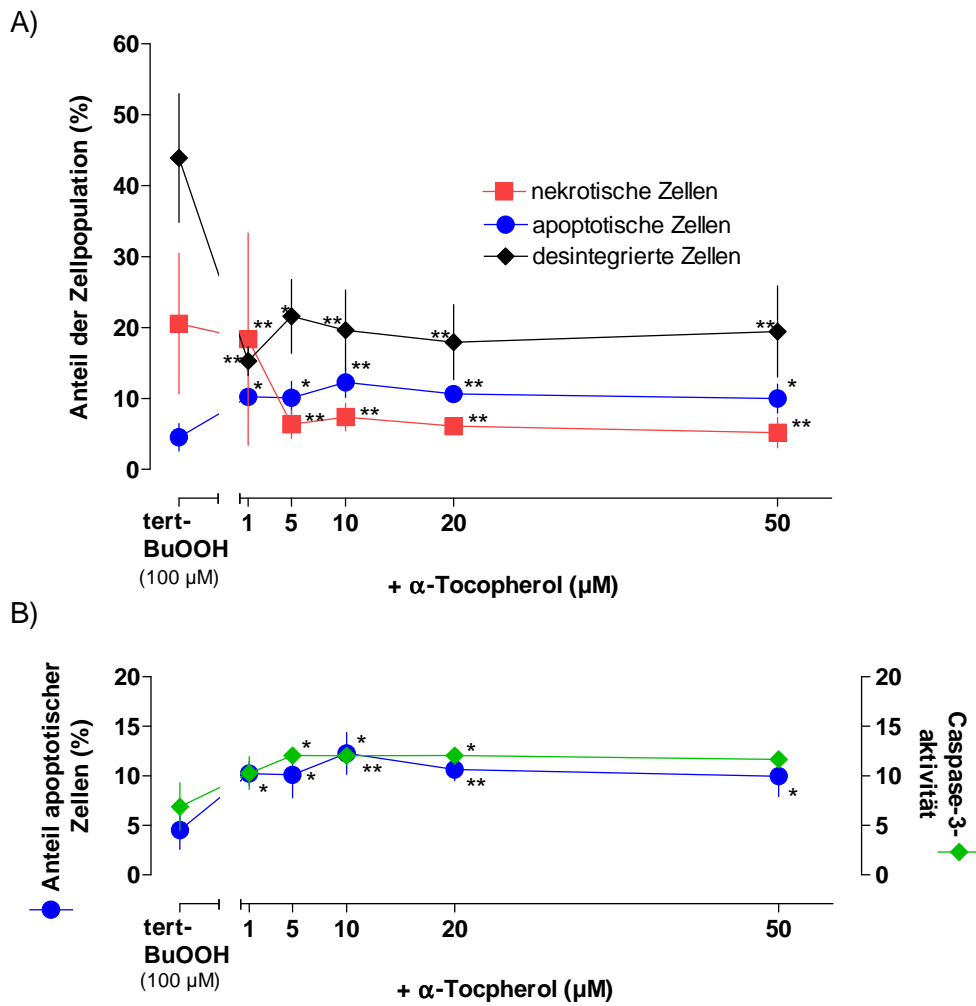


Abbildung 3.33: **Einfluss von α -Tocopherol auf die zytotoxische Wirkung von tert-BuOOH**

Die C6-Zellen wurden über 24 h mit den α -Tocopherol-Konzentrationen 1, 5, 10, 20 und 50 μ M vorinkubiert und anschließend über weitere 24 h mit 100 μ M tert-BuOOH behandelt. Im linken Teil der X-Achse sind die Wirkungen von 100 μ M tert-BuOOH allein gezeigt, im rechten Teil in Kombination mit dem Antioxidans in aufsteigenden Konzentrationen. Abbildung A zeigt die prozentualen Anteile apoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation. In Abbildung B sind vergrößert die Anteile apoptotischer Zellen zusammen mit der Aktivität der Caspase-3 (nmol p-NA/mg Protein u. 3 h) dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 3 Experimenten; *p < 0,05; **p < 0,01 verglichen mit den jeweiligen Kontrollen.

3 Ergebnisse

In Abbildung 3.34 werden durch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von C6-Zellkernen die Ergebnisse zur Beeinflussung des Zelltods durch α -Tocopherol noch einmal zusammengefasst. Gezeigt sind C6-Zellkerne nach Exposition mit dem jeweiligen Peroxid über 24 h mit und ohne α -Tocopherol-Vorinkubation.

Bei den organischen Peroxiden wurden Aufnahmen von der niedrigsten α -Tocopherol-Konzentration gewählt, bei der eine zytoprotektive Wirkung beobachtet wurde. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen verdeutlichen, dass die Vorinkubation mit α -Tocopherol C6-Zellen deutlich vor dem durch organische Peroxide ausgelösten Zelltod schützt. Im Gegensatz zu den nicht mit α -Tocopherol vorinkubierten Zellen sind bei den mit α -Tocopherol behandelten Zellen deutlich niedrigere Anteile nekrotischer Zellen erkennbar.

Weiterhin wird aus den Aufnahmen deutlich, dass bei C6-Zellen, die unter den beschriebenen Versuchsbedingungen mit Wasserstoffperoxid behandelt worden sind, durch Vorinkubation mit α -Tocopherol keine Zytoprotektion besteht. Bei den organischen Peroxiden ist die maximale zytoprotektive Wirkung mit 5 μ M α -Tocopherol erreicht. Eine weitere Erhöhung der α -Tocopherol-Konzentration steigert die zytoprotektive Wirkung nicht. Die Vorinkubation mit α -Tocopherol führt nach Behandlung mit organischen Peroxiden zu einer erhöhten Induktion von Apoptose. Die Induktion von Apoptose tritt in einem stärkeren Ausmaß bei tert-BuOOH als bei CHP auf. In Abbildung 3.34 sind apoptotische Zellen mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Unter den angewandten Peroxidkonzentrationen wären die C6-Zellen ohne Vorinkubation mit α -Tocopherol durch Nekrose zu Grunde gegangen. Durch die Vorinkubation mit α -Tocopherol ist nicht nur ein Großteil der Zellpopulation vor oxidativem Schaden und Zelltod geschützt, sondern darüber hinaus ein kleinerer Teil der Population in der Lage den apoptotischen Zelltod einzuleiten. Mit anderen Worten bewirkt α -Tocopherol in einer bestimmten Zellpopulation ein Umschalten der Art des Zelltods von Nekrose zu Apoptose.

3 Ergebnisse

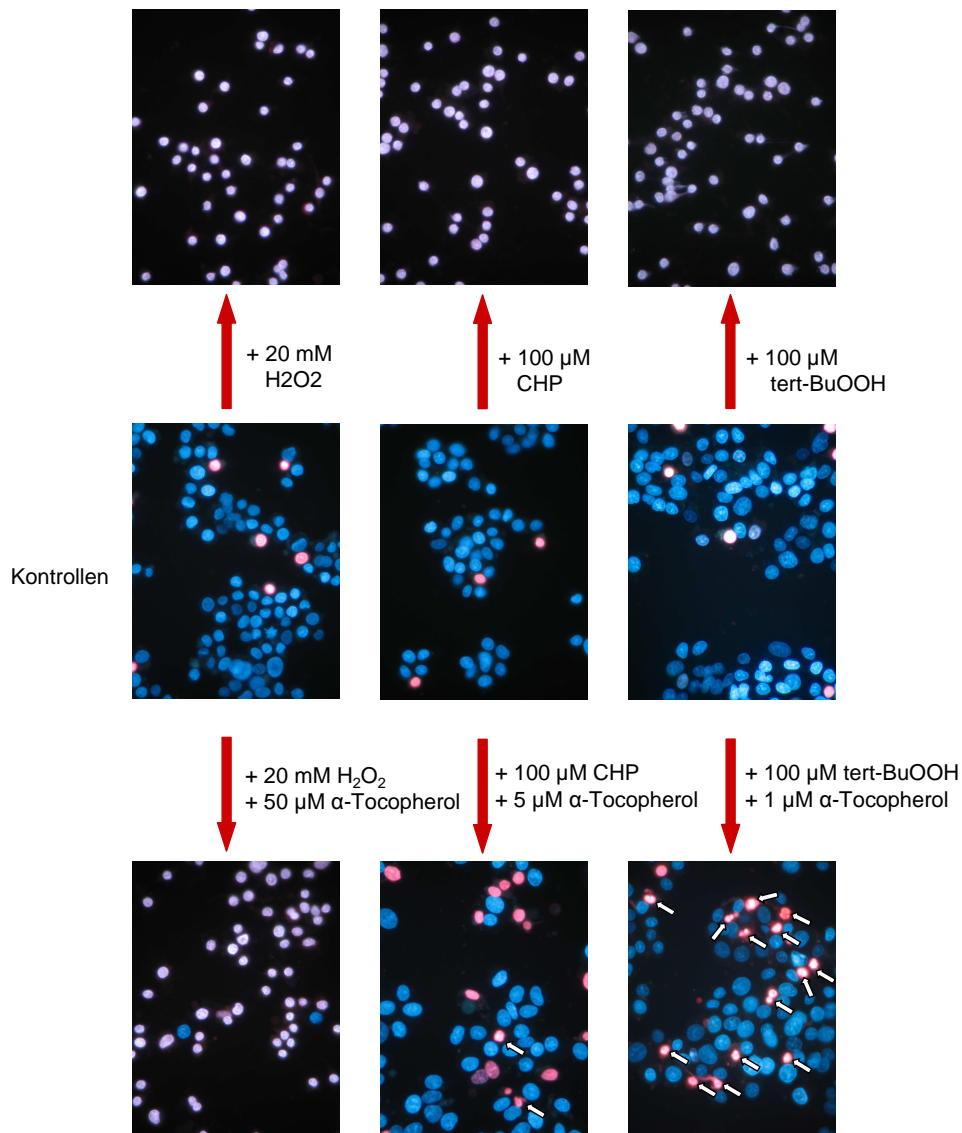


Abbildung 3.34: **Zytoprotektive Wirkung von α -Tocopherol**

Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von C6-Zellkernen nach Anfärbung mit Hoechst 33342 und Propidiumjodid. In der mittleren Bilderreihe sind die Zellkerne unbehandelter Kontrollen gezeigt. Darüber liegende Aufnahmen zeigen Kerne von Zellen, die über 24 h mit einer zytotoxischen Peroxidkonzentration behandelt worden sind. Die unterhalb der Kontrollen befindlichen Aufnahmen zeigen Kerne von C6-Zellen, die mit einer zytotoxischen Peroxidkonzentration nach Vorinkubation mit α -Tocopherol behandelt worden sind. Die Aufnahmen erfolgten bei 400 facher Vergrößerung mit dem Zeiss Fluoreszenzmikroskop.

3.5 Zelltod durch permanenten oxidativen Stress

In den vorangegangenen Versuchen wurden die konzentrations- und zeitabhängigen Wirkungen von Wasserstoffperoxid nach einer Bolusgabe beschrieben. Unter derartigen Bedingungen wird H_2O_2 von den Zellen mehr oder minder schnell abgebaut, wobei die anfänglich vorhandene Konzentration sinkt und schon nach kurzer Zeit Null erreichen kann. In dem nun folgenden Kapitel werden die Wirkungen von kontinuierlich gebildetem H_2O_2 auf C6-Zellen gezeigt. Zur fortwährenden Produktion von H_2O_2 wurde das Enzym Glucoseoxidase verwendet, welches durch Umsetzung der im Medium vorhandenen Glucose H_2O_2 erzeugt.

Das Anlegen der C6-Kulturen in den 100 mm Schalen erfolgte analog zu den Peroxidversuchen (vgl. Abschnitt 2.5.2.1). Am Versuchstag wurden die Zellen mit verschiedenen Glucoseoxidase-Konzentrationen inkubiert. Mit Zugabe des Enzyms zu dem auf 37°C erwärmten DMEM setzte die Produktion von H_2O_2 ein. Die H_2O_2 -Konzentrationen wurden mit Hilfe der unter 2.6.4 nach Dringen et al. (1998) beschriebenen Methode in An- und Abwesenheit von Zellen im Medium photometrisch bestimmt. In Abbildung 3.35 sind die im Medium gemessenen H_2O_2 -Konzentrationen in Abwesenheit von Zellen dargestellt. Abbildung 3.35 A zeigt den Anstieg der H_2O_2 -Konzentrationen im Medium in Abhängigkeit von der eingesetzten Glucoseoxidase-Konzentration über die Zeit. Der Anstieg war über den Messzeitraum von 6 h nahezu linear. In Abwesenheit von Glucoseoxidase wurde kein H_2O_2 im Medium gemessen. In Tabelle 3.2 sind die H_2O_2 -Produktionsraten pro Minute angegeben. Mit einer Verdopplung der Enzymkonzentration verdoppelt sich auch die H_2O_2 -Produktionsrate. Dieser Zusammenhang geht noch deutlicher aus Abbildung 3.35 B hervor, in der die H_2O_2 -Produktionsraten pro Minute gegen die Enzymkonzentration aufgetragen sind. Die Abbildung zeigt, dass die H_2O_2 -Produktionsrate eine lineare Funktion der Enzymkonzentration ist. Aus der Steigung der Geraden ergibt sich eine spezifische Aktivität der Glucoseoxidase von 21,8 nmol/ $\mu\text{g} \times \text{min}$.

3 Ergebnisse

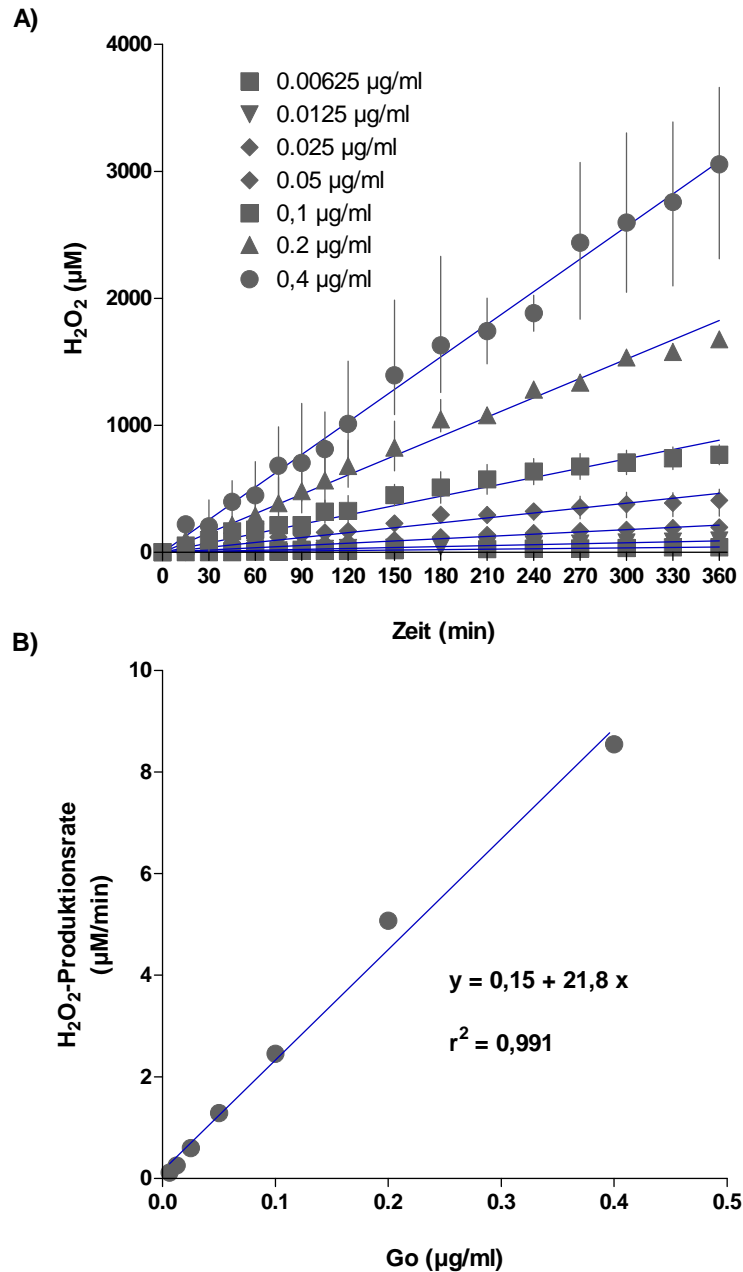


Abbildung 3.35: **Wasserstoffperoxidproduktion durch Glucoseoxidase in Abwesenheit von Zellen**

Abbildung A zeigt den Konzentrationsverlauf von H_2O_2 in DMEM mit verschiedenen Glucoseoxidase-Konzentrationen über den Meßzeitraum von 6 h. Gezeigt sind die Regressionsgeraden sowie Mittelwerte und Spannweiten der Meßwerte von $n = 3$ Experimenten. In Abbildung B sind die H_2O_2 -Produktionsraten pro Minute in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration dargestellt.

Tabelle 3.2: H_2O_2 -Produktionsraten in Abhängigkeit von der eingesetzten Glucoseoxidase-Konzentration

Gezeigt sind die aus den Steigungen der Regressionsgeraden (s. Abb. 3.35) ermittelten Produktionsraten pro Minute. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

Glucoseoxidase-Konzentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	H_2O_2 -Produktionsrate ($\mu\text{M}/\text{min}$)
0,0625	$0,12 \pm 0,01$
0,0125	$0,26 \pm 0,01$
0,025	$0,60 \pm 0,01$
0,05	$1,29 \pm 0,04$
0,1	$2,46 \pm 0,08$
0,2	$5,07 \pm 0,12$
0,4	$8,55 \pm 0,31$

Parallel zu den Messungen ohne Zellen wurde der H_2O_2 -Konzentrationsverlauf in Anwesenheit von Zellen bestimmt. Wie in Abbildung 3.36 A dargestellt, ist bei niedrigen Glucoseoxidase-Konzentrationen ($\leq 0,05 \mu\text{g}/\text{ml}$) kein H_2O_2 extrazellulär im Medium messbar. Mit anderen Worten gesagt, wurde das bei diesen Glucoseoxidase-Konzentrationen kontinuierlich gebildete H_2O_2 vollständig von den Zellen eliminiert. Wurden die C6-Zellen mit höheren Konzentrationen der Glucoseoxidase inkubiert (0,1 - 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), konnte das gebildete H_2O_2 nicht mehr vollständig von den Zellen abgebaut werden. Es stellten sich nach 60 Minuten nahezu konstante H_2O_2 -Spiegel (Steady-State) ein. Diese sind in Abbildung 3.36 als Kurven aus mehreren Einzelexperimenten dargestellt.

Auffallend ist, dass sich die gebildeten Steady-State-Konzentrationen in den einzelnen Versuchen bei gleicher Glucoseoxidase-Konzentration in ihrer Höhe unterscheiden. Dies könnte mit einer von Versuch zu Versuch leicht unterschiedlichen Zellkonzentration begründet werden, welche die Geschwindigkeit der H_2O_2 -Elimination beeinflusst und somit auch die Höhe der sich einstellenden Steady-State-Konzentration. Waren mehr Zellen vorhanden, wurde mehr H_2O_2 pro Minute abgebaut, wodurch die Höhe der Steady-state-Konzentration niedriger ausfiel. Vergleicht man die Kurvenverläufe aller 4 eingesetzten Glucoseoxidase-Konzentrationen miteinander, so zeigt

3 Ergebnisse

sich, dass die Höhe der gebildeten Steady-State-Konzentration von der eingesetzten Konzentration der Glucoseoxidase abhängig ist. Bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Glucoseoxidase wurde eine sich aus den Einzelversuchen ergebene mittlere Steady-State-Konzentration von 6 μM gemessen. Bei 0,2 $\mu\text{g/ml}$ lag die mittlere Konzentration bei 31 μM , bei 0,4 $\mu\text{g/ml}$ bei 110 μM . Wie aus den Einzelversuchen ersichtlich blieb die Steady-State-Konzentration über den Inkubationszeitraum von 6 h nahezu konstant.

3 Ergebnisse

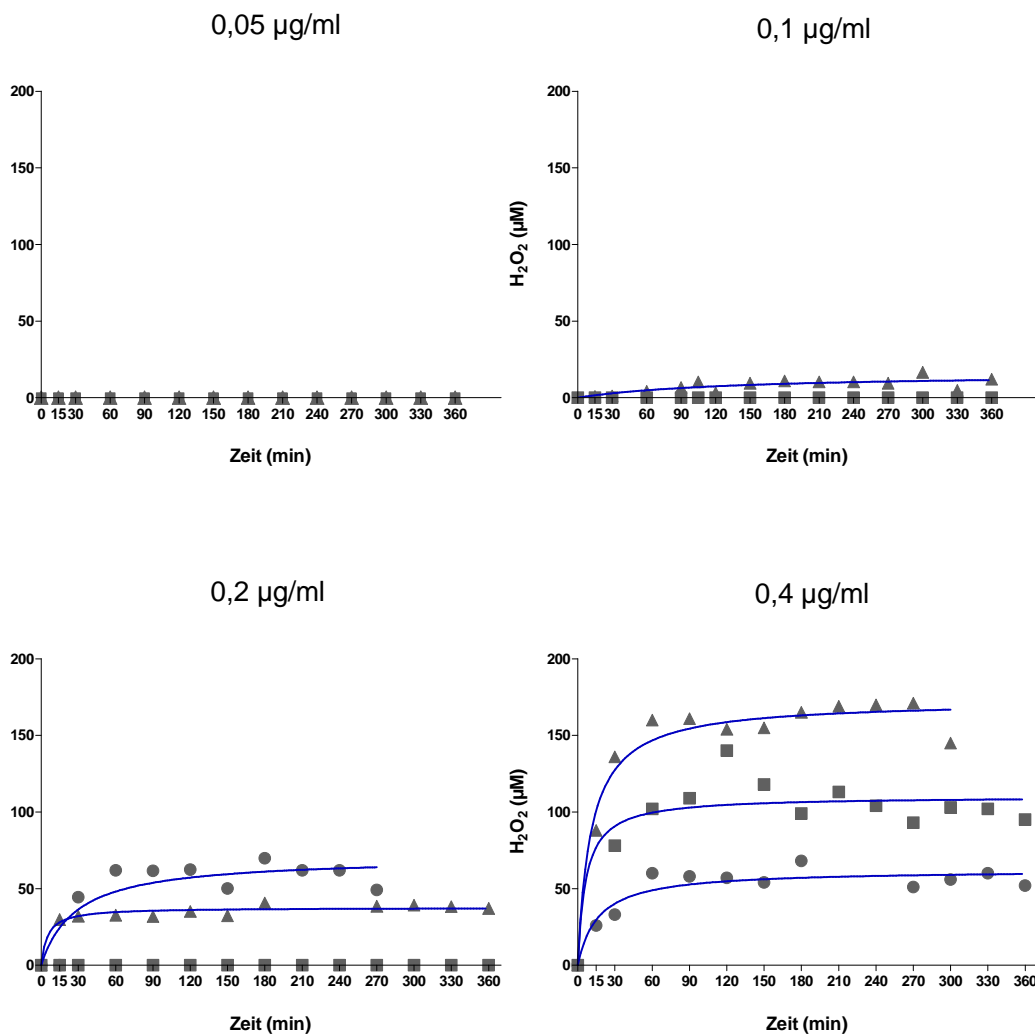


Abbildung 3.36: H_2O_2 -Konzentrationen bei Inkubation von C6-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Glucoseoxidase
Gezeigt sind die sich einstellenden H_2O_2 -Spiegel bei den Glucoseoxidase-Konzentrationen von 0,05; 0,1; 0,2 und 0,4 $\mu g/ml$. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einzelnen Experimenten mit den oben genannten Glucoseoxidase-Konzentrationen. Zur Anpassung der Kurven wurde eine hyperbolische Funktion verwendet.

3 Ergebnisse

Während der Inkubation mit Glucoseoxidase wurden die Zellen nach Ablauf von 2 h, 4 h, 6 h und 24 h auf die Wirkungen von permanentem oxidativen Stress mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse und Caspase-3-Bestimmung untersucht. Abbildung 3.37 zeigt auf welche Weise, durch Apoptose oder Nekrose, C6-Zellen bei kontinuierlicher H_2O_2 -Exposition sterben. Durch Exposition mit $0,05 \mu\text{g/ml}$ Glucoseoxidase veränderte sich weder der prozentuale Anteil nekrotischer noch der Anteil apoptotischer Zellen. Das bei dieser Enzymkonzentration gebildete H_2O_2 löste somit noch keine schwerwiegenden Zellschäden aus, die im Beobachtungszeitraum von 24 h zum Zelltod führten.

Hingegen zeigte sich bei der Exposition mit $0,1 \mu\text{g/ml}$ Glucoseoxidase nach Ablauf von 4 h ein kleiner, aber signifikanter Anstieg im prozentualen Anteil nekrotischer Zellen von 17,1 %. Der prozentuale Anteil desintegrierter Zellen stieg erst nach 6 h geringfügig an und erfolgt zeitlich gesehen nach dem Anstieg nekrotischer Zellen. Nach 24 h sind 22,9 % nekrotisch und 17,2 % der Zellen desintegriert. Zelltod durch Apoptose wurde auch bei $0,1 \mu\text{g/ml}$ nicht beobachtet.

Zelltod durch Nekrose fand in größerem Ausmaß durch den Einsatz von $0,2 \mu\text{g/ml}$ Glucoseoxidase statt. Anders als bei $0,1 \mu\text{g/ml}$ erhöhte sich bei $0,2 \mu\text{g/ml}$ bereits nach 2 h der Anteil nekrotischer Zellen signifikant im Vergleich zur Kontrolle und lag nach 4 h bei 35,3 %. Der Anteil desintegrierter Zellen veränderte sich in den ersten 4 h kaum, stieg dann aber zeitversetzt zum Anstieg der Nekrose nach 6 h auf 36,5 % an. Der Anteil nekrotischer Zellen befand sich nach 6 h mit 29,2 % leicht darunter. Die 24-stündige Exposition führte im Vergleich zu 6 h zu keinen merklichen Änderungen im Anteil nekrotischer Zellen (25,4 %) und desintegrierter Zellen (38,3 %). Auch bei $0,2 \mu\text{g/ml}$ wurde kein Zelltod durch Apoptose beobachtet.

Bei der Exposition mit $0,4 \mu\text{g/ml}$ Glucoseoxidase kam es anders als bei den niedrigeren Konzentrationen schon nach 2 h zu einem massiven Anstieg nekrotischer Zellen (59,8 %). Nach 4 h befanden sich alle Zellen entweder im Zustand der Nekrose oder waren bereits desintegriert. Im Vergleich zu 2 h sank der Anteil nekrotischer Zellen nach 4 h auf 46,9 % und weiter nach 6 h auf 23,5 % ab, während sich im Gegenzug durch den zunehmenden Zerfall nekrotischer Zellen in Fragmente und nicht mehr herunterzentrifugierbarer Zellbruchstücke der Anteil desintegrierter Zellen nach 6 h signifikant auf 76,5 % erhöhte. Der Abfall des prozentualen Anteils nekrotischer Zellen

3 Ergebnisse

und der zeitverzögerte Anstieg desintegrierter Zellen ist auch bei den niedrigeren Enzymkonzentrationen erkennbar, doch wird er bei 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Glucoseoxidase durch die hohe kontinuierlich vorhandene H_2O_2 -Konzentration besonders deutlich. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse ergab im Vergleich zu 6 h nach 24-stündiger Exposition keine nennenswerten Veränderungen im prozentualen Anteil nekrotischer (32,0 %) und desintegrierter Zellen (68,0 %). Zelltod durch Apoptose wurde wie bei den niedrigeren Glucoseoxidase-Konzentrationen nicht beobachtet.

Stellt man den zeitlichen Verlauf des Zelltods als Summe aus dem prozentualen Anteil nekrotischer und desintegrierter Zellen graphisch dar, so gelangt man zu der in unter 3.38 gezeigten Abbildung. Bei Exposition mit 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Glucoseoxidase wurden wie zuvor in Abbildung 3.36 gezeigt keine messbaren Peroxidspiegel aufgebaut. Sämtliches H_2O_2 wurde sofort von den Zellen abgebaut. Dazu passend zeigte die Zellvitalität bei Exposition mit 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Glucoseoxidase, wie Abbildung 3.38 verdeutlicht, über den gesamten Meßzeitraum von 24 h keine Veränderungen. Die Konzentration 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Glucoseoxidase verursachte somit keine Zellschäden, die zum Zelltod führten. Bei Exposition mit 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Glucoseoxidase wurde das gebildete H_2O_2 nicht mehr vollständig abgebaut. Es verblieb eine stetig vorhandene Restkonzentration von 6 μM im System. Ein Viertel der Zellpopulation starb in den ersten 6 h. Nach 24 h sind im Mittel 40,4 % der Zellen gestorben. Im Vergleich zur Kontrolle entspricht dies einer Erhöhung toter Zellen um 25,9 %.

Durch eine weitere Erhöhung der Glucoseoxidase-Konzentration stieg auch der stetig vorhandene H_2O_2 -Spiegel. Bei 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Glucoseoxidase waren dies im Mittel 31 μM . Unter diesen Bedingungen setzte eine zellschädigende Wirkung bereits nach 2 h ein. Nach vier Stunden waren 44,1 % der Zellpopulation gestorben. Der Anteil toter Zellen erhöhte sich nach 6 Stunden auf 65,8 %. Nach 24 h stieg der Prozentsatz toter Zellen nicht weiter an. Bei 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Glucoseoxidase hatte sich nach 60 Minuten ein mittlerer H_2O_2 -Spiegel von 110 μM aufgebaut. Diese kontinuierlich vorhandene Peroxidkonzentration führte, wie in Abbildung 3.38 dargestellt, nach 2 h in über der Hälfte der Zellen zum Zelltod. Die vierstündige Exposition ließ die Überlebensrate gegen 0 sinken.

Wie Abbildung 3.38 verdeutlicht, entstanden nur bei den Glucoseoxidase-Konzentrationen irreversible Schäden, die zum Zelltod führten, bei denen mehr H_2O_2 durch

3 Ergebnisse

das Enzym produziert worden ist als von den Zellen abgebaut werden konnte. Immer dort, wo meßbare H_2O_2 -Spiegel vorhanden waren, wurde Zelltod ausgelöst. Geringe Mengen kontinuierlich gebildeten Wasserstoffperoxids, wie sie durch $0,05 \mu\text{g/ml}$ Glucoseoxidase produziert wurden, hatten keinen Zelltod zur Folge hatten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß des Zelltods und die Geschwindigkeit seines Eintritts von der eingesetzten Glucoseoxidase-Konzentration und den damit gebildeten H_2O_2 -Konzentrationen abhängig ist. Je höher die eingesetzte Enzymkonzentration, desto schneller erfolgte der Eintritt des Zelltods und desto höher war der Anteil toter Zellen. Die Geschwindigkeit, mit der der Zelltod durch Wasserstoffperoxid in den C6-Zellen ausgelöst wurde, spricht für einen vornehmlich nekrotischen Zelltod. Dies konnte durch die fluoreszenzmikroskopische Analyse bestätigt werden. Bei allen eingesetzten Glucoseoxidase-Konzentrationen wurde der Zelltod allein durch Nekrose ausgelöst. Die Zahl apoptotischer Zellen blieb bei allen Konzentrationen über den gesamten Expositionszeitraum auf Kontrollniveau. Dementsprechend konnte auch keine Aktivitätssteigerung der Caspase-3 gemessen werden. Somit löst die permanente Anwesenheit kleiner H_2O_2 -Konzentrationen bei C6-Zellen im Gegensatz zur Bolusgabe ausschließlich Zelltod durch Nekrose aus.

3 Ergebnisse

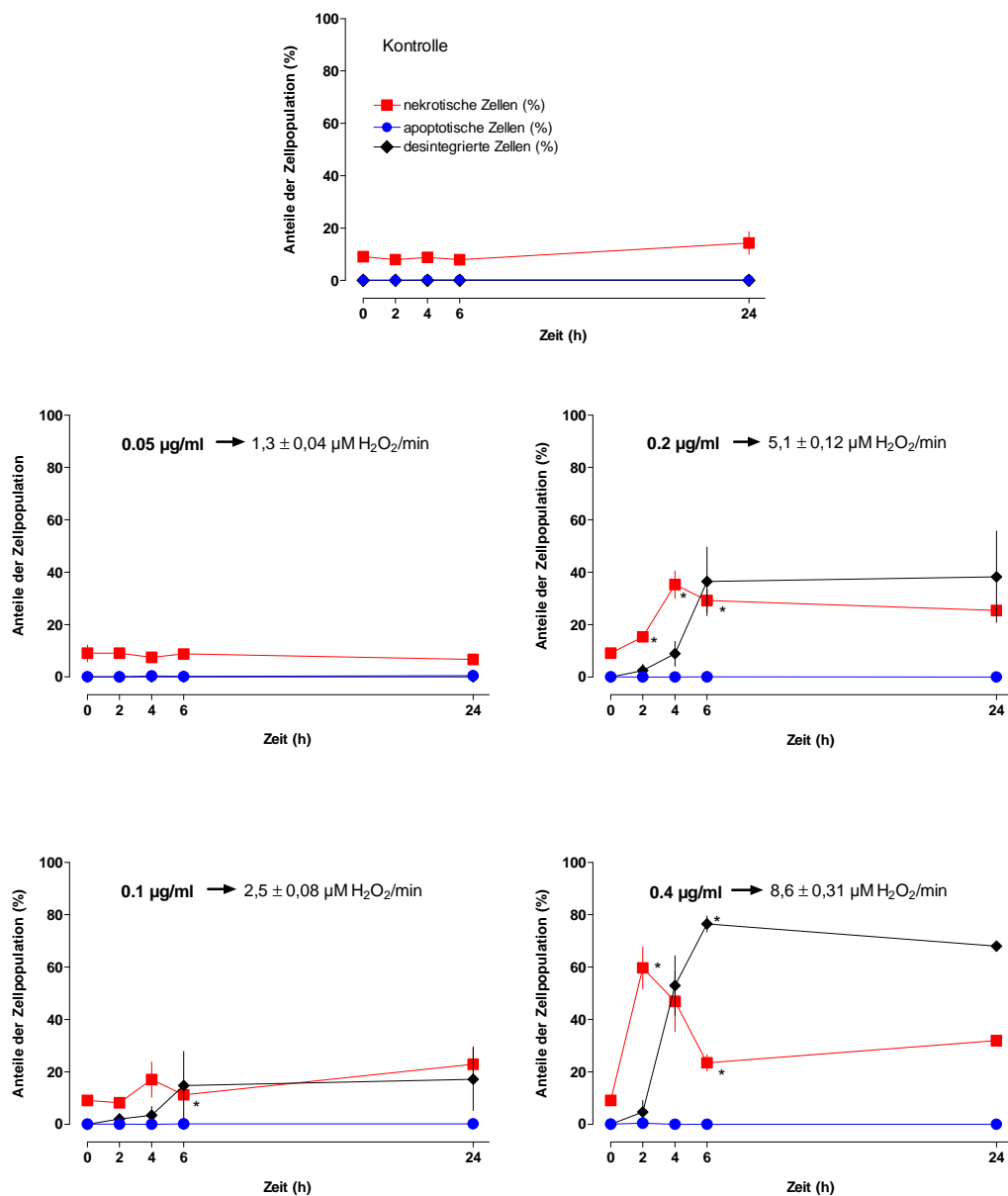


Abbildung 3.37: **Zelltod in Abhängigkeit von den eingesetzten Glucoseoxidase Konzentrationen**

Gezeigt sind die Prozentsätze apoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n=3$ Experimenten bei 0,1; 0,2; 0,4 $\mu\text{g/ml}$ Glucoseoxidase. Bei der Konzentration 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Glucoseoxidase wurde nur ein Experiment durchgeführt. Die angegebenen H_2O_2 -Produktionsraten wurden der Tabelle 3.2 entnommen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$: signifikanter Unterschied (gepaarter t-Test) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

3 Ergebnisse

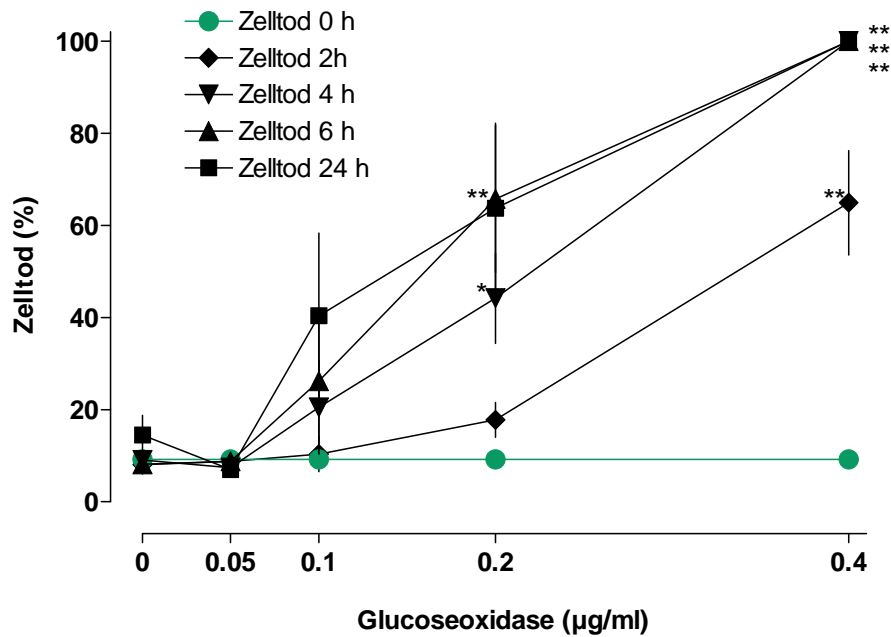


Abbildung 3.38: **Zelltod durch Exposition gegenüber kontinuierlich gebildetem H_2O_2**

Die C6-Zellen wurden mit verschiedenen Glucoseoxidase-Konzentrationen über 24 h exponiert. Der Prozentsatz der toten Zellen ergibt sich aus der Summe der desintegrierten und nekrotischen Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n=3$ Experimenten zu jeder Glucoseoxidase-Konzentration. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$: signifikanter Unterschied (ANOVA) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

4 Diskussion

Oxidativer Stress kann neben den in der Einleitung vorgestellten Wirkungen auch den Tod der Zelle zur Folge haben. Zelltod kann im wesentlichen durch zwei Mechanismen erfolgen, durch Apoptose oder Nekrose. In dieser Arbeit wurde die Einteilung in apoptotischen oder nekrotischen Zelltod aufgrund des morphologischen Erscheinungsbildes der Kerne und der Aktivierung von Caspasen getroffen, wohlwissend dass diese Unterteilung eine vereinfachte Darstellung ist und auch andere Formen des Zelltods existieren (Degterev und Yuan, 2008). Nekrose ist ein relativ passiver Prozess, der mit einem schnellen Abfall des zellulären ATP-Gehalts verknüpft ist. Morphologisch gesehen ist Nekrose durch eine starke Zunahme des Zellvolumens und einer sich anschließenden Ruptur der Zellmembran charakterisiert. Dabei wird der gesamte Inhalt der Zelle einschließlich der lytischen Enzyme in den Extrazellulärraum entlassen, was die Schädigung der benachbarten Zellen nach sich zieht (Wyllie, 1997; Robertson und Orrenius, 2000). Apoptose hingegen ist eine aktive, zelluläre Antwort auf physiologische oder pathologische Zustände. Morphologische Charakteristika sind das Schrumpfen der Zelle, Chromatinkondensation und Segmentierung der Zelle in membrangebundene, apoptotische Körperchen (Kerr et al., 1972).

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst mit Hilfe des Alkaloids Staurosporin geeignete, quantitative Nachweismethoden für den apoptotischen und nekrotischen Zelltod entwickelt, die auch ermöglichen sollten, den Einfluss von Expositionszeit und Konzentration über die Dauer der Behandlung zu verfolgen. Die Ergebnisse der Behandlung von C6-Astrogliazellen mit Staurosporin werden im folgenden Kapitel kurz diskutiert.

4.1 Auslösung und Nachweis des apoptotischen Zelltods in C6-Zellen mit Staurosporin

Um geeignete Nachweismethoden für den apoptotischen und nekrotischen Zelltod zu etablieren und um herauszufinden, ob in C6-Zellen Apoptose induziert werden kann, wurden zunächst Versuche mit der Apoptose-auslösenden Substanz Staurosporin unternommen. Hierzu wurden die C6-Zellen hinsichtlich charakteristischer Apoptosemerkmale wie Chromatinkondensation und Caspaseaktivierung untersucht. Darüber hinaus wurde die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Induktion von Apoptose in C6-Zellen durch Staurosporin analysiert.

4.1.1 Staurosporin

Staurosporin ist ein von *Streptomyces staurosporeus* produziertes Alkaloid, welches erstmals von Omura et al. (1977) isoliert werden konnte. Seine Wirkung beruht auf einer unspezifischen Hemmung verschiedener Proteinkinasen. Staurosporin interagiert mit der ATP-Bindungsstelle von Proteinkinasen und verhindert dadurch die Bindung von ATP. Proteinkinase C wird von Staurosporin am stärksten gehemmt (Tamaoki et al., 1986). Neben der Wirkung als potenter Proteinkinaseinhibitor verfügt Staurosporin über die Eigenschaft in einer Vielzahl von Tumorzelllinien Zelltod durch Apoptose hervorzurufen, wie zum Beispiel in den humanen Leukämie-Zelllinien MOLT-4 und HL-60-Zellen, in den Lymphoma-Zelllinien SUDHL16 und CA46 und in der Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 (Bertrand et al., 1994; Falcieri et al., 1993; Jarvis et al., 1994). Daneben wurde auch in Linsene epithel-Zellen (Andersson et al., 2000), in Lymphozyten (Lucas et al., 1994), in Myocyten (Yue et al., 1998) und in Neuronen (Koh et al., 1995) Zelltod durch Apoptose nach Staurosporinexposition nachgewiesen. Im Gegensatz zu anderen Apoptose-auslösenden Substanzen wie Cisplatin, welches in höheren Dosen durch Schädigung der an der Apoptose direkt oder indirekt beteiligter Proteine auch nekrotischen Zelltod verursachen kann (Gonzalez et al., 2001), ist für Staurosporin bisher nur der apoptotische Zelltod beschrieben worden. Nicht desto trotz kann auch Staurosporin Nekrose auslösen, wenn zuvor die

zellulären ATP-Speicher entleert worden sind (Nicotera et al., 1999). Die intrazellulären Kaskaden, die zur Auslösung von Apoptose durch Staurosporin führen, sind weitestgehend unbekannt. In der Arbeit von Kruman et al. (1998) wurde berichtet, dass die Behandlung von PC12-Zellen mit Staurosporin eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, Lipidperoxidation und apoptotische Veränderungen der Kerne zur Folge hatte. Die intrazelluläre Calciumkonzentration spielt eine wichtige Rolle bei der Auslösung von Apoptose (Orrenius et al., 2003). Kruman et al. (1998) postulierten aus den Ergebnissen ein Szenario, bei dem Staurosporin über die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zur ROS-Bildung führt. Durch ROS verursachte Schäden der Mitochondrienmembran wird Apoptose eingeleitet. Darüber hinaus soll Staurosporin sowohl Caspase-abhängig über die Aktivierung der Caspase-3 (Chae et al., 2000) als auch Caspase-unabhängig zum Zelltod durch Apoptose führen (Belmokhtar et al., 2001).

In der Literatur wird Staurosporin in einem sehr breiten Konzentrationsbereich zur Auslösung von Apoptose verwendet. Zur Etablierung der Nachweismethoden für den apoptotischen Zelltod und zur Untersuchung des in C6-Zellen ausgelösten Zelltods durch Staurosporin wurden die Konzentrationen 0,1 $\mu\text{g/ml}$ und 1 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

4.1.2 Charakterisierung des Staurosporin-induzierten Zelltods

Der apoptotische Zelltod ist durch charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen der Zelle gekennzeichnet (Cohen, 1993). So schrumpft der Zellkörper, das Chromatin kondensiert, Phosphatidylserin wird von der Membrannenseite auf die Außenseite verlagert, proteolytische Enzyme, die Caspasen, werden aktiviert und die DNA wird durch nukleare Endonukleasen in Bruchstücke zerschnitten. Zur Charakterisierung des apoptotischen Zelltods von C6-Zellen durch Staurosporin wurden die morphologischen Veränderungen der Zellen und der Zellkerne sowie die Aktivität der Capsase-3 näher untersucht.

4.1.2.1 Morphologie der Zellen

Die Veränderung in der Morphologie der Zellen wurde über die Dauer der Staurosporin-Exposition bei zwei verschiedenen Konzentrationen (0,1 und 1 $\mu\text{g/ml}$ und 1 $\mu\text{g/ml}$) verfolgt. Erste Veränderungen wurden an den C6-Zellen bereits nach 4 h bei 1 $\mu\text{g/ml}$ Staurosporin und mit zunehmender Behandlungsdauer auch bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$ sichtbar (siehe auch Abbildung 3.2). Es kam dabei zu einer Verkürzung der Fortsätze, einer zunehmenden Zahl von Lücken in der ehemals konfluenten Kultur und zum Auftreten von kleinen Bläschen, die sich vornehmlich an den Fortsätzen der Zellen befanden. Ganz ähnliche Beobachtungen machten Deckwerth und Johnson an sympathischen Neuronen neonataler Ratten, in denen durch NGF-Entzug Apoptose induziert wurde (Deckwerth und Johnson, 1993). Sie beschrieben die an der neuronalen Plasmamembran gebildeten Schwellungen als kleine Perlen an einer Schnur. Bei den gebildeten Bläschen könnte es sich um das sogenannte Membranblebbing handeln, einem Phänomen, welches im frühen Stadium der Apoptose auftreten kann.

4.1.2.2 Zellkernmorphologie und Chromatinkondensation

Morphologische Veränderungen des Zellkerns sind ein zentrales Merkmal apoptotischer Zellen, welche sich mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar machen lassen. Die Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33342 und Propidiumjodid wurden verwendet, um die Anzahl lebender, nekrotischer und apoptotischer Zellen zu quantifizieren.

Die Zellkerne lebender Zellen in den unbehandelten Kulturen haben eine runde bis ovale Form. Das Chromatin ist gleichmäßig verteilt und weist eine Art Struktur auf. Kerne apoptotischer Zellen, die zuvor mit Staurosporin behandelt wurden, sind kleiner, das Chromatin ist hochkondensiert und fluoresziert nach Anfärbung mit Hoechst 33342 gleichförmig. Das Chromatin kann dabei in Form von Halbmonden an der Kernmembran angelagert sein oder als einzelne oder Gruppe hellleuchtender Kugeln erscheinen. Dies ist das typische Erscheinungsbild von Kernen apoptotischer Zellen (Coles et al., 1993).

4 Diskussion

Für die Versuche mit Staurosporin wurden zwei verschiedene Konzentrationen (0,1 und 1,0 $\mu\text{g/ml}$) verwendet. Morphologische Veränderungen des Zellkerns, die auf Apoptose hindeuteten, wie Chromatinkondensation und das Schrumpfen der Kerne, wurden durch Behandlung mit Staurosporin 1,0 $\mu\text{g/ml}$ nach 4 h sichtbar. Im Verlauf der Exposition stieg der Prozentsatz apoptotischer Kerne bei dieser Konzentration kontinuierlich an und erreichte nach 24 h 18 % bezogen auf die Gesamtpopulation. Durch den Verlust der Membranintegrität war ein Großteil der apoptotischen Kerne zu diesem Zeitpunkt durch Propidiumjodid rot gefärbt. In der niedrigeren Konzentration kam es erst nach 24 h zu einem nennenswerten Anstieg apoptotischer Kerne. Der Anteil apoptotischer Kerne in der Kontrolle lag zu diesem Zeitpunkt unter einem Prozent. Nekrotischer Zelltod wurde bei Staurosporin-Exposition nicht beobachtet.

Die Versuche mit Staurosporin haben gezeigt, dass die auf Apoptose hindeutenden Veränderungen in der Kernmorphologie in C6-Zellen abhängig sind von der eingesetzten Konzentration und der Expositionszeit. Darüber hinaus wird das Ausmaß der morphologischen Veränderungen von der Höhe der eingesetzten Staurosporin-Konzentration bestimmt. Ähnliche Beobachtungen zur Zeitabhängigkeit machten Andersson et al. (2000) an bovinen Linsenepithelzellen. Auch hier zeigten sich erste apoptotische Kerne nach 4 bis 6 h. Nach 24 h war auch die Mehrzahl der Kerne durch den Verlust der Membranintegrität Propidiumjodid-positiv.

4.1.2.3 Caspase-3-Aktivität

Apoptose ist ein komplexer Prozess, der neben den charakteristischen, morphologischen Veränderungen der Zellen durch die Aktivität zahlreicher Proteasen gekennzeichnet ist. Die wichtigsten, die sogenannten Cysteiny-Aspartat-spezifischen Proteinasen (Caspasen) (Alnemri et al., 1996), spielen während der Apoptose eine entscheidende Rolle und deren Aktivität gilt daher als weiterer, wichtiger Nachweis für den apoptotischen Zelltod. Der Caspase-3, die zu den sogenannten Effektor-caspasen gehört, kommt während der Apoptose eine zentrale Schlüsselposition zu (Nicholson et al., 1995). Sie spaltet spezifisch eine Reihe von Proteinen wie z.B. Fodrin, Gelsolin, ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) und weitere Proteine, die an der Regulierung der Apoptose beteiligt sind (Slee et al., 2001). Darüber

hinaus ist die Caspase-3 auch in apoptotischen Veränderungen des Zellkerns, wie Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung, involviert (Porter und Jänicke, 1999).

Die Aktivität der Caspasen kann auf verschiedene Arten gemessen werden. Zum einen mit Hilfe von Antikörpern, die an die Caspase selbst oder an ein Spaltprodukt binden (z.B. PARP-Antikörper), zum anderen durch Messung der Enzymaktivität durch Spaltung von künstlichen Substraten. Diese Substrate bestehen aus einer bestimmten Aminosäuresequenz und einer chromophoren oder fluochromen Gruppe, die von der zu untersuchenden Caspase abgespalten wird. Die Absorption oder Fluoreszenz der vom Peptidsubstrat abgespaltenen Gruppe kann anschließend gemessen werden. Zur Messung der Caspase-3-Aktivität in den mit Staurosporin behandelten C6-Zellen wurde ein kolorimetrischer Assay verwendet, der auf der Hydrolyse des Peptidsubstrates Acetyl-ASP-GLU-VAL-ASP-para-Nitroanilin (Ac-DEVD-pNA) basiert. Grundsätzlich werden die meisten der Caspasesubstrate nicht nur von einer spezifischen Caspase gespalten, sondern auch von anderen Mitgliedern der Caspasefamilie, allerdings in geringerem Ausmaß. Die erhaltenen Ergebnisse stellen somit die gemeinsame Aktivität mehrerer Caspasen dar. Da die Caspase-3-Aktivität den Hauptteil der gemessenen Aktivität ausmacht, wird im folgenden nur von Caspase-3-Aktivität gesprochen.

Die in Abbildung 3.7 dargestellten Ergebnisse zeigen eine deutliche Aktivitätssteigerung der Caspase-3 in C6-Zellen durch Staurosporin. Die Aktivität erhöhte sich nach den ersten 4 h und erreichte nach 24 h einen maximalen Wert. Die Höhe der Caspase-3-Aktivität ist abhängig von der eingesetzten Staurosporin-Konzentration und von der Expositionszeit. Ein ähnlicher Befund ergab sich bei den Untersuchungen von Meller et al. (2002) zur Caspaseaktivität in C6-Zellen nach Staurosporinbehandlung. Darüber hinaus wiesen Meller et al. (2002) eine zeitabhängige Aktivierung der Effektorcaspasen 3 bzw. 7 und 6 nach, wobei die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 der Aktivierung der Caspase 6 vorausging. Bemerkenswert ist, dass auch in den unbehandelten Kontrollen eine gewisse Grundaktivität der Caspase-3 zu messen ist. Dies passt zu den Ergebnissen aus den morphologischen Untersuchungen. Auch dort wurden in den unbehandelten Kontrollen einige wenige apoptotische Kerne gefunden. Gorman et al. (2000) haben bei Ihren Versuchen mit C6-Zellen nach Apoptosein-

duktion mit Staurosporin ebenfalls eine Grundaktivität messen können. Dies spricht dafür, dass auch ohne äußeren Einfluss einige wenige Gliazellen spontan Apoptose durchlaufen.

4.1.2.4 Zeitabhängige Effekte

Trägt man alle gemessenen Parameter, wie die Anteile apoptotischer, spätapoptotischer, nekrotischer und desintegrierter Zellen sowie die Caspase-3-Aktivität, in einem Graphen zusammen auf, so kann man Rückschlüsse über den zeitlichen Ablauf der einzelnen Ereignisse während des apoptotischen Zelltods ziehen. Es zeigte sich, dass die Aktivierung der Caspase-3 zeitlich gesehen vor der Kernkondensation stattfindet. Die Caspase-3 ist maßgeblich an der Fragmentierung des Zellinventars beteiligt (Slee et al., 2001). Neben der Zerlegung verschiedener Zytoskelettelemente und Zellhaftstrukturen, aktiviert die Caspase-3 eine Nuclease (CAD), die für Chromatin-kondensation und DNA-Fragmentierung im Zellkern verantwortlich ist (Enari et al., 1998).

Nach 24 h ist ein Großteil der ehemals apoptotischen Zellen durch den Verlust der Zellmembranintegrität und der daraus resultierenden Durchlässigkeit für Propidiumjodid in den spätapoptotischen Zustand übergegangen. Der Verlust der Zellmembranintegrität ist ein eher spätes Ereignis im apoptotischen Prozess. In vivo zerfällt die Zelle im Anschluss in apoptotische Körperchen, die von Nachbarzellen und Makrophagen endocytiert werden (Savill et al., 1989). In vitro findet eine sogenannte sekundäre Nekrose statt, bei der die apoptotischen Körperchen anschwellen und platzen. Diese Zellfragmente sind mit der verwendeten Umdrehungszahl nicht herunterzentrifugierbar und werden in der Proteinbestimmung nicht erfasst. Dadurch ist auch der Anstieg desintegrierter Zellen erklärt, welcher sich aus dem Unterschied des Proteingehalts der Probe und der zugehörigen Kontrolle in Prozent errechnet. Über 30 % der Zellen sind nach 24 h desintegriert. Ein weiterer Aspekt wird aus Abbildung 3.8 deutlich. Staurosporin verursacht unter den gewählten Versuchsbedingungen in C6-Zellen ausschließlich Zelltod durch Apoptose. Zu keiner Zeit kommt es zu einem Anstieg des prozentualen Anteils nekrotischer Zellen. Hiermit bestätigt sich die Eingangs erwähnte Aussage, dass Staurosporin ein Induktor von Apoptose ist.

4.2 Charakterisierung des Peroxid-induzierten Zelltods

4.2.1 Zytotoxizität der Peroxide

Die Untersuchungen zur Zytotoxizität (vgl. Abschnitt 3.3.1) haben gezeigt, dass der Peroxid-induzierte Zelltod in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des Peroxids und der Expositionszeit ausgelöst wird. Dabei unterschieden sich die verwendeten Peroxide in ihrer zytotoxischen Potenz und Kinetik voneinander.

Die zytotoxische Wirkung von H_2O_2 trat im Vergleich zu den organischen Peroxiden, CHP und tert-BuOOH, am schnellsten ein. Dies wird durch den Vergleich der EC_{50} -Werte nach einstündiger Exposition deutlich ($\text{EC}_{50} \text{H}_2\text{O}_2$ 686 μM ; $\text{EC}_{50} \text{CHP} > 1000 \mu\text{M}$; $\text{EC}_{50} \text{tert-BuOOH} > 2000 \mu\text{M}$). Bereits nach 2 h findet eine Umkehr in der Rangliste der zytotoxischen Potenz statt. CHP weist nun den niedrigsten EC_{50} -Wert auf, gefolgt von H_2O_2 und tert-BuOOH. CHP hat im Vergleich zu den anderen Peroxiden den niedrigsten EC_{50} -Wert nach 2, 4, 24 und 48 h. Die zytotoxische Wirkung von tert-BuOOH setzte sehr langsam ein. Ähnlich wie bei CHP fand aber von 2 nach 4 h eine starke Verschiebung der Zytotoxizitätskurven nach links statt. Allen drei Peroxiden ist gemeinsam, dass für die Auslösung von Zelltod die ersten 24 h entscheidend sind. Es besteht kein Unterschied zwischen den EC_{50} -Werten nach 24 h und den EC_{50} -Werten nach 48 h.

Die Unterschiede in der zytotoxischen Potenz und der „zytotoxischen Kinetik“ der organischen Peroxide und Wasserstoffperoxid könnten ursächlich mit unterschiedlichen Wirkungen und Wirkorten der Radikale in Zusammenhang stehen. H_2O_2 diffundiert als unpolares Molekül entweder frei oder mittels spezifischer Transportsysteme (Aquaporine) durch die Zellmembran (Halliwell und Gutteridge, 1985; Bienert et al., 2006). Das aus H_2O_2 in Gegenwart von Eisen oder Kupfer gebildete Hydroxylradikal reagiert durch seine hohe Reaktivität direkt an seinem Bildungsort. Welche Art von Zellschäden dabei entstehen, hängt daher mit dem Bildungsort des Hydroxylradikals zusammen. Die Bildung von Hydroxylradikalen in der Nähe der DNA führt zu Basenmodifikationen und Strangbrüchen (Halliwell und Gutteridge, 1985). Das

lipophile CHP und seine Radikale reagieren vornehmlich mit Strukturen innerhalb der Zellmembran (Vroegop et al., 1995). Darüber hinaus verursachen die organischen Peroxide, CHP und tert-BuOOH, im Gegensatz zu H_2O_2 Lipidperoxidation (Linden et al., 2008). Der schnellere Eintritt des Zelltods durch H_2O_2 zu Beginn der Exposition könnte damit erklärt werden, dass H_2O_2 durch die Fähigkeit frei oder über Aquaporine durch Membranen diffundiert schneller als die organischen Peroxide wichtige Strukturen der Zelle erreicht, sie schädigt und damit Zelltod auslöst.

Die größere zytotoxische Potenz von CHP kann möglicherweise mit den für den Abbau verantwortlichen Enzymen erklärt werden. Die organischen Peroxide werden nur durch die Glutathion-Peroxidase abgebaut, während H_2O_2 sowohl durch Glutathion-Peroxidase als auch durch Katalase abgebaut wird (Dringen et al., 1999). Der effizientere Abbau von H_2O_2 im Vergleich zu CHP in DMEM ist auch bei Brenner et al. (2010) beschrieben.

Die Abhängigkeit der Auslösung des Zelltods von der Konzentration und Expositionszeit des eingesetzten Peroxids wurde auch durch Abe und Saito (1998) bei tert-BuOOH und Whittemore et al. (1995) bei H_2O_2 in Studien an corticalen Neuronen und Astrozyten der Ratte nachgewiesen. Nach Whittemore et al. (1995) führte Wasserstoffperoxid in einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ nach 3 h zu keiner nennenswerten Reduktion der Zellviabilität, wohingegen $100\ \mu\text{M}$ die Zahl lebender Zellen auf weniger als 50 % reduzierte. Nach zwölf Stunden war auch die Zahl lebender Zellen bei $10\ \mu\text{M}$ merklich reduziert (50 %). In den Versuchen mit C6-Zellen lag nach 48 h der EC_{50} -Wert bei $32\ \mu\text{M}$ und damit um das dreifache höher als bei Whittemore et al. (1995) nach 12 h. Die Unterschiede in den EC_{50} -Werten sind zum einen bedingt durch die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien, aber auch wie in der Arbeit von Whittemore und auch bei Dringen et al. (1999) beschrieben, abhängig von der Zellkonzentration. So lag bei Whittemore et al. (1995) der EC_{50} -Werte bei einer Aussaatdichte von $(7 \times 10^4/\text{cm}^2)$ bei $30\ \mu\text{M}$ und bei einer höheren Aussaatdichte von $(2 \times 10^5/\text{cm}^2)$ bei $100\ \mu\text{M}$. Der Zusammenhang von zytotoxischer Potenz und Zellkonzentration lässt sich mit einer größeren Entgiftungskapazität bei höherer Zellkonzentration erklären (Gülden et al., 2010).

4.2.2 Radikalbildung durch Peroxide

Entscheidend für die Entfaltung der zytotoxischen Wirkung der Peroxide ist die Umwandlung zu Radikalen. Wasserstoffperoxid und die organischen Peroxide werden in der Eisen-abhängigen Fenton-Reaktion zu Radikalen umgewandelt. Aus H_2O_2 wird dabei das Hydroxylradikal gebildet (Halliwell und Gutteridge, 1992). Die organischen Peroxide bilden Alkyl- und Alkoxyradikale (Taffe et al., 1987). In der Zelle erfolgt die Bildung dieser Radikale in einer durch Häm-Proteine (Methaemoglobin und Cytochrom P450) vermittelten Reaktion (Coon et al., 1996, Hix et al., 2000). Die aus den organischen Peroxiden gebildeten Radikale stellen Analoga zu den aus Peroxidationsprozessen gebildeten Radikalen biologischer Membranen dar und können Lipidperoxidation in Zellen auslösen (Karlsson et al., 2000). In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der unter 2.6.2 beschriebenen Methode die intrazelluläre Radikalbildung über die Dauer von 2 h gemessen. Es zeigte sich, dass die Radikalbildung von der Expositionszeit und der eingesetzten Peroxidkonzentration abhängig ist.

Karlsson et al. (2000) stellten durch Vergleiche der Konzentrations-Zeit-Profile der Radikalbildung mit der Zytotoxizität von tert-BuOOH fest, dass die Radikalbildung zu einem früheren Zeitpunkt stattfindet als das Einsetzen der Zytotoxizität. Somit wären die Radikale für die Entfaltung der zytotoxischen Wirkung verantwortlich. Diese Theorie wird unterstützt durch Untersuchungen von Zielinska et al. (2003), bei der sich C6-Glioma-Zellen in Gegenwart des Eisenchelators Deferoxamin weniger empfindlich gegenüber den zytotoxischen Wirkungen von CHP zeigten.

4.2.3 Nekrotischer und apoptotischer Zelltod durch Peroxide

Die mit Hilfe von Staurosporin etablierten Methoden zur Bestimmung des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen sowie die Messung der Caspase-3-Aktivität wurden dazu verwendet, den Peroxid-induzierten Zelltod zu untersuchen. In der Literatur ist in vielen Arbeiten beschrieben worden, dass die Höhe des oxidativen Stresses für den Zelltod durch Apoptose oder Nekrose entscheidend ist (Lennon et al., 1991; Burlacu et al., 2001; Gardner et al., 1997; Palomba et al., 1996). Hohe Konzentra-

tionen von Oxidantien rufen Nekrose hervor, während niedrigere Konzentrationen für einen apoptotischen Zelltod verantwortlich sein sollen. Einige der in diesen Arbeiten vorgestellten Ergebnisse basieren auf nicht-quantitativen Auswertungen, in denen zwar Zelltod durch Apoptose oder Nekrose nachgewiesen wurde, aber die prozentualen Anteile apoptotischer oder nekrotischer Zellen nicht bestimmt worden sind. Andere Arbeiten wiederum beschreiben nur die Apoptose als den durch Oxidantien induzierten Zelltod (Whittemore et al., 1994, Kanno et al., 1999). Die vorliegenden Arbeit soll daher zeigen, auf welche Weise und in welchem Ausmaß C6-Zellen sterben, wenn diese mit unterschiedlichen Peroxidkonzentrationen behandelt werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss der Expositionszeit auf den Peroxid-induzierten Zelltod untersucht werden. Und schließlich, ob sich Unterschiede in der Wirkung durch die strukturell unterschiedlichen Peroxide ergeben. Daher wurde das unpolare H_2O_2 und die lipophileren Peroxide CHP und tert-BuOOH als Modellsubstanzen zur Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies verwendet.

4.2.4 Wirkung von Wasserstoffperoxid

Gardner et al. (1997) zeigten mittels qualitativer Nachweismethoden, dass H_2O_2 Zelltod in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration durch Apoptose oder Nekrose in murinen Fibroblasten auslösen kann. Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit des Zelltods bei C6-Zellen wurden H_2O_2 -Konzentrationen von 0,01-50 mM eingesetzt. Nach 24 h wurden die morphologischen Veränderungen der Kerne fluoreszenzmikroskopisch analysiert und als weiteren Hinweis auf apoptotischen Zelltod die Aktivität der Caspase-3 gemessen. Die Versuche zur Konzentrationsabhängigkeit haben gezeigt, dass in C6-Zellen durch Exposition mit hohen H_2O_2 -Konzentrationen (ab 10 mM) ausschließlich Nekrose stattfand. Der Anteil nekrotischer Zellen nahm beginnend ab 2 mM stetig zu. Der Anteil der desintegrierten Zellen lag bereits in den niedrigen Peroxid-Konzentrationen oberhalb des Kontrollniveaus und erhöhte sich mit zunehmender Peroxidkonzentration. Durch niedrigere H_2O_2 -Konzentrationen (0,1 und 0,2 mM) wurde in einem kleinen Teil der Zellpopulation Zelltod durch Apoptose ausgelöst, während der Anteil nekrotischer Zellen nach 24 h in den genannten Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht war. Ein maximaler Anteil apoptotischer Zellen ergab sich bei 0,2 mM H_2O_2 mit 4 %.

4 Diskussion

In den Versuchen zur Zeitabhängigkeit ergab sich nur bei 2 mM in den ersten 6 h ein Anstieg im Anteil nekrotischer Zellen. In den niedrigeren Konzentrationen 0,1 und 0,2 mM war nur der Anteil der desintegrierten Zellen nach 6 h leicht, aber signifikant erhöht, nicht aber der Anteil nekrotischer Zellen. Zelltod durch Apoptose trat in den verwendeten Konzentrationen erst nach 24 h auf.

Neben Gardner et al. (1997) beschrieben weitere Autoren, dass niedrige H_2O_2 -Konzentrationen Apoptose auslösen, höhere dagegen Nekrose (Lee und Shacter, 1999; Burlacu et al., 2001; Lennon et al., 1991). So konnten Saito et al. (2006) bei Jurkat T-Lymphozyten in einer Studie mit H_2O_2 über 6 h zeigen, dass Wasserstoffperoxid in geringen Konzentrationen (0,05 mM) einen Anstieg in der Anzahl apoptotischer Zellen bewirkte. Ähnlich wie in den Versuchen mit C6-Zellen sank die Apoptoserate bei höheren H_2O_2 -Konzentrationen, wohingegen die Nekroserate bei Konzentrationen oberhalb von 0,05 mM merklich anstieg. In den Versuchen von Saito et al. (2006) ergab sich ein maximaler Anteil apoptotischer Zellen bei 0,05 mM von 42 %. Der höhere Prozentsatz im Anteil apoptotischer Zellen kann zum einen mit der Verwendung einer anderen Zelllinie begründet werden, ist aber mit Sicherheit auch auf die Art der Auswertung zurückzuführen. Saito et al. (2006) verwendeten Aliquots behandelter Zellen, die zentrifugiert, in PBS resuspendiert und per Durchflusszytometrie analysiert wurden. Die gezeigten Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen beziehen sich somit nur auf die Anteile sedimentierter Zellen. Bereits desintegrierte Zellen sind nicht mit in die Betrachtung eingeflossen. Die Angaben sind nicht auf die Gesamtpopulation bezogen und sind daher allein aufgrund der Auswertung höher.

Als ein bestimmender Faktor für die Einleitung von Apoptose oder Nekrose wird der zelluläre ATP-Gehalt diskutiert. Apoptose ist ein aktiver, ATP-verbrauchender Prozess (Lelli et al., 1998, Kass et al., 1996). H_2O_2 bewirkt die Entleerung intrazellulärer ATP-Speicher durch die PARP-Aktivierung (Lee und Shacter, 1999), das Enzym, welches die H_2O_2 -verursachten DNA-Strangbrüche (Lee et al., 2001) repariert. Möglich ist, dass in höheren H_2O_2 -Konzentrationen die ATP-Speicher der Zelle soweit entleert worden sind, dass nicht ausreichend ATP zur Bildung des ATP-abhängigen Apoptosomenkomplexes während der Apoptose zur Verfügung steht (Saito et al., 2006). Apoptose, ausgelöst durch einen klassischen Apoptose-Induktor wie Staurosporin,

4 Diskussion

kann zur Nekrose verschoben werden, wenn nicht genügend intrazelluläres ATP vorhanden ist (Leist et al., 1997). Niedrige H_2O_2 -Konzentrationen bewirken nur einen vorübergehenden ATP-Abfall. In höheren Konzentrationen ist der ATP-Abfall irreversibel. Somit bestimmt letztendlich das Ausmaß der ATP-Speicherentleerung, das über die H_2O_2 -Konzentration gesteuert wird, welcher Zelltod nach H_2O_2 -Exposition eintritt (Lee und Shacter, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde einhergehend mit dem Anstieg apoptotischer Zellen eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität im Bereich von 0,1-2 mM gemessen. Oberhalb dieser Konzentrationen sank die Caspaseaktivität wieder ab. Ab 5 mM sank die Caspaseaktivität unterhalb der Caspaseaktivität, die in der Kontrolle gemessen wurde. Dies ist gleichzeitig diejenige Konzentration, bei der die Nekroseraten deutlich anstiegen.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch Hampton und Orrenius (1997) in Jurkat T-Lymphozyten machen. Hier wurde ein deutlicher Anstieg der Caspaseaktivität bei 0,05 mM beobachtet, gefolgt von einem Abfall bei höheren H_2O_2 -Konzentrationen. In höheren Konzentrationen (0,5 mM) wurde nekrotischer Zelltod eingeleitet. Der Konzentrationsbereich, bei dem H_2O_2 Apoptose bzw. Nekrose auslöst, scheint abhängig zu sein vom Zelltyp (Veal et al., 2007), aber auch von der Zellkonzentration. Whittemore et al. (1995) zeigten, dass Zelltod durch H_2O_2 in corticalen Neuronen der Ratte in Abhängigkeit von der Zelldichte ausgelöst wird.

Hampton und Orrenius stellten fest, dass die Caspasen erst mit einer dreistündigen Verzögerung aktiviert wurden. Bei den Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Wirkung von H_2O_2 in C6-Zellen wurde ebenfalls eine zeitliche Verzögerung im Anstieg der Caspase-3-Aktivität beobachtet. Die Versuche mit den drei H_2O_2 -Konzentrationen (0,1; 0,2; 2 mM) haben gezeigt, dass Zelltod durch Nekrose bereits nach 2 h und nur bei der höchsten eingesetzten H_2O_2 -Konzentration von 2 mM in signifikantem Maße ausgelöst wurde. Ein Anstieg in der Caspase-3-Aktivität zeigte sich zeitverzögert nach 24 h, ebenso wie der Anstieg im prozentualen Anteil apoptotischer Zellen. Eine mögliche Ursache für die zeitliche Verzögerung der Aktivierung der Caspasen und des ersten Auftretens apoptotischer Zellen könnte in einer oxidativen Inaktivierung der Caspasen liegen. Die Cystein-Gruppen im aktiven Zentrum der Caspasen bilden eine potentielle Zielstruktur für Oxidationsprozesse. Borutaite und Brown (2001) konn-

ten zeigen, dass H_2O_2 Caspasen reversibel inaktivieren kann. Das als Antioxidanz fungierende DTT verhinderte bzw. hob die H_2O_2 -vermittelte Inaktivierung der Caspasen, welche vermutlich auf eine reversible Oxidation der Thiol-Gruppe im Cystein zurückzuführen ist, auf. Die Thiolgruppen könnten durch in der Zelle vorkommende Antioxidantien wieder reduziert werden und damit die Inaktivierung der Caspasen wieder aufgehoben werden.

Die Wirkung von H_2O_2 auf C6-Zellen lässt sich also folgendermaßen zusammenfassen: Durch H_2O_2 induzierter, oxidativer Stress führt zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Reduktion der Zellvitalität. Die Zellen sterben in der Hauptsache durch Nekrose. Niedrige H_2O_2 -Konzentrationen lösen in einem schmalen Konzentrationsbereich (0,1 und 0,2 mM) und nur in einem kleinen Teil der Zellpopulation Apoptose aus. Die H_2O_2 -induzierte Apoptose tritt im Vergleich zu Staurosporin zeitverzögert auf.

4.2.5 Wirkung der organischen Peroxide CHP und tert-BuOOH

Die Zytotoxizitätsstudien mit den organischen Peroxide CHP und tert-BuOOH haben gezeigt, dass C6-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration und der Expositionszeit sterben. Welcher Zelltod in C6-Zellen durch organische Peroxide eingeleitet wird, sollte als weitere Fragestellung geklärt werden. Die von Vimard et al. (1996) durchgeführten Untersuchungen an PC12-Zellen mit CHP lassen einen nekrotischen Zelltod vermuten. Karlsson et al. (2000) fanden, dass der tert-BuOOH-induzierte Zelltod in Zellen des Mesencephalus der Ratte fast ausschließlich durch Nekrose erfolgte. Wo hingegen in zahlreichen anderen Zelllinien der mit tert-BuOOH ausgelöste Zelltod als Apoptose identifiziert wurde (U-937-Macrophagen (400 μM , 4 h) Kanupriya et al., 2007, SH-SY5Y Neuroblastomzellen (25 μM , 24 h) und N2A Zellen (50 μM , 12 h) Zhao et al., 2005). Haidara et al. (2002) zeigten, dass in Hepatozyten der Ratte Zelltod mittels tert-BuOOH in Abhängigkeit von der Konzentration durch Apoptose oder Nekrose erfolgen kann.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit des ausgelösten Zelltods nach 24-stündiger Exposition mit Konzentra-

4 Diskussion

tionen von 10-200 μM haben gezeigt, dass es sich bei dem in C6-Zellen induzierten Zelltod in der Hauptsache um Nekrose handelt. Niedrige Konzentrationen (CHP 10 und 20 μM , tert-BuOOH 10, 20 und 50 μM) führten zu keiner erhöhten Zelltodrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In höheren Konzentrationen organischer Peroxide war ein Großteil der Zellen desintegriert oder nekrotisch. Bei tert-BuOOH ergab sich in einem engen Konzentrationsbereich (0,05 mM) ein geringer (1%), aber dennoch signifikanter Anstieg apoptotischer Zellen. Wie bei H_2O_2 hat der Proliferationsstatus der Zellen keinen Einfluss auf die Art des ausgelösten Zelltods. Der durch CHP und tert-BuOOH ausgelöste Zelltod wurde auch in Abhängigkeit von der Expositionszeit von 0-48 h untersucht. Es zeigte sich, dass der Zelltod durch Nekrose innerhalb der ersten 2 Stunden einsetzte. Nekrotische Zellen desintegrierten im Verlauf der Exposition, was an den zeitlich versetzten Kurven für Desintegration und Nekrose deutlich wird. Bei CHP war bereits nach zwei Stunden ein großer Anteil der Zellpopulation desintegriert, was dafür spricht, dass die nekrotische Wirkung von CHP schneller einsetzt als die von tert-BuOOH. Apoptose und Aktivierung der Caspase-3 wurde über den gesamten Expositionszeitraum bei keiner Peroxidkonzentration in signifikantem Maße beobachtet. Eine Aktivierung der Effektor-Caspase-3 wurde auch bei Haidara et al. (2002) in primären Hepatocyten nicht beobachtet. Möglich ist, dass die Einleitung von Apoptose schon an einer früheren Stelle durch tert-BuOOH und CHP blockiert wurde.

Welcher Mechanismus dafür verantwortlich ist, dass ein kleiner Teil der C6-Zellpopulation bei Exposition mit H_2O_2 in der Lage ist Apoptose einzuleiten, bei Exposition mit den organischen Peroxiden aber nicht, bleibt offen. In der Arbeit von Lemasters et al. (1999) wird ein Mechanismus, wie tert-BuOOH zum nekrotischen Zelltod führt, beschrieben. Danach kommt es durch tert-BuOOH zu einem Anstieg von freiem Calcium und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in den Mitochondrien. Dies führt wiederum zur Bildung einer Pore in der inneren Mitochondrienmembran (MPTP = mitochondrial permeability transition pore). Durch Bildung der MPTP kommt es zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, Entkopplung der Atmungskette, Hemmung der ATP-Synthese und letztendlich zum nekrotischen Zelltod durch massiven ATP-Verlust. Betrifft die Bildung der MPTP nur eine Subpopulation von Mitochondrien und wird noch ausreichend ATP produziert, kann auch Apoptose

eingeleitet werden (Ott et al., 2007). Demnach wäre also der zelluläre ATP-Gehalt entscheidend für die Art des Zelltods und eine vergleichende Bestimmung könnte möglicherweise eine Erklärung für den Mechanismus liefern.

4.3 Einfluss von Antioxidantien auf den Peroxid-induzierten Zelltod

Zur Untersuchung des Einflusses der Antioxidantien, Quercetin und α -Tocopherol, auf den Peroxid-induzierten Zelltod wurden C6-Zellen in 100 mm Schalen-Kulturen mit einer zytotoxisch wirkenden Peroxidkonzentration behandelt. Im Falle des Quercetins wurden die Zellen in Gegenwart des Polyphenols mit dem jeweiligen Peroxid exponiert. Wie in der Arbeit von Amano et al. (1994) und in experimentellen Arbeiten aus unserem Labor belegt, schützt α -Tocopherol Zellen nur dann vor Peroxid-induziertem oxidativem Stress, wenn diese zuvor mit dem Vitamin vorinkubiert wurden. Daher wurden für die Versuche mit α -Tocopherol die Zellen über 24 Stunden vorinkubiert.

4.3.1 Quercetin

Quercetin zeigte in Versuchen über 24 h in niedrigen Konzentrationen bis 20 μ M keine zytotoxischen Wirkungen. Hingegen wirkten 50 und stärker noch 100 μ M zytotoxisch. Es wurde in diesen Konzentrationen Zelltod sowohl durch Nekrose als auch durch Apoptose induziert. Nach 24 h waren bei 50 μ M 41,4 % der Zellen tot, 5,6 % apoptotisch, 8,9 % nekrotisch und 26,9 % desintegriert. Bei 100 μ M Quercetin war der Prozentsatz nekrotischer Zellen (14,7 %) zu Lasten eines geringer ausfallenden Prozentsatzes apoptotischer Zellen (3,1 %) erhöht. Den größten Anteil toter Zellen machte wie bei 50 μ M Quercetin der Anteil desintegrierter Zellen (32,4 %) aus. Die in höheren Konzentrationen zytotoxische Wirkung des Quercetins wurde bereits in der Arbeit von Zielinska et al. (2003) beschrieben. 100 μ M Quercetin führten hier ähnlich wie in den oben beschriebenen Ergebnissen zu einer 50 % Reduktion der Zahl lebender Zellen. Es wird kontrovers diskutiert, ob reaktive Sauerstoffspezi-

es an der durch Quercetin hervorgerufenen Zytotoxizität beteiligt sind. Shih et al. (2004) stellten fest, dass der Quercetin-induzierte Zelltod durch das Enzym Katalase verhindert werden kann, während Wätjen et al. (2005) keinen Hinweis darauf finden konnte, dass die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies an der Zytotoxizität beteiligt sein könnte. Deferoxamin erwies sich bei Quercetinexposition als nicht zytoprotektiv.

Eine Apoptose-induzierende Wirkung von Quercetin wurde in vielen Tumorzelllinien nachgewiesen (Humane Leukämie-Jurkat-T-Zellen (Chen et al., 2005), Lungenkrebszelllinie A549 (Nguyen et al., 2004), Melanomzellen B16-BL6 (Zhang et al., 2005)). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass apoptotischer Zelltod ausgelöst durch Quercetin unter Beteiligung von Caspase-3 verlief. Dies ist auch für andere Zelllinien nach Behandlung mit Quercetin beschrieben worden (Wätjen et al., 2005; Shih et al., 2004; Russo et al., 1999; Wang et al., 1999).

Aus den dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass Quercetin konzentrationsabhängig die zytotoxische Wirkung der verwendeten Peroxide H_2O_2 , CHP und tert-BuOOH verringert. Die Zytoprotektion findet in einem sehr engen Konzentrationsbereich statt. Quercetin wirkte in Gegenwart der Peroxide, CHP und tert-BuOOH, stärker zytoprotektiv als in Gegenwart von H_2O_2 . Eine maximale zytoprotektive Wirkung bei Exposition mit H_2O_2 zeigte sich bei der höchsten eingesetzten Quercetin-Konzentration von $50\ \mu\text{M}$, einer Konzentration also, die sich in den Quercetinversuchen selbst als zytotoxisch erwiesen hat. Der Prozentsatz toter Zellen verringerte sich bei dieser Konzentration von 96,2 % auf 54,3 %. Bei den organischen Peroxiden zeigte die subtoxische Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ Quercetin die stärkste zytoprotektive Wirkung. Der Prozentsatz toter Zellen verringerte sich bei CHP von 96 % auf 22,6 % und bei tert-BuOOH von 100 % auf 34,2 %. Bei der Konzentration von $50\ \mu\text{M}$ stieg der Prozentsatz toter Zellen bedingt durch die oben beschriebenen zytotoxischen Eigenschaften des Quercetins in höheren Konzentrationen wieder an. Als möglicher Mechanismus für die zytoprotektive Wirkung kommen die Scavenger-Eigenschaften von Quercetin (Boots et al., 2008) oder die Chelatbildung mit zweiwertigen Metallionen (Rice-Evans et al., 1996) in Frage.

In den Versuchen wurde gezeigt, dass Quercetin den vornehmlich nekrotischen Zelltod, wie er durch hohe Konzentrationen von H_2O_2 , CHP und tert-BuOOH ausgelöst

wird, unterdrückt. Im Zuge einer sinkenden Gesamtzahl toter Zellen steigt die Anzahl apoptotischer Zellen und einhergehend auch die Caspase-3-Aktivität. Dies wird besonders bei der Quercetin-Konzentration mit der stärksten zytoprotektiven Wirkung deutlich.

Boots et al. (2007) beschrieben in diesem Zusammenhang ein Phänomen, dass sie als Quercetin-Paradoxon bezeichneten. Quercetin ist in der Lage RLE-Zellen vor einem durch H_2O_2 verursachten Schaden der DNA zu schützen. Die Behandlung von RLE-Zellen mit Quercetin und H_2O_2 führte aber zu einer Erhöhung der Calciumkonzentration im Zytosol, zur Absenkung der GSH-Level und LDH-Leakage sowie ersten Anzeichen von Apoptose und verminderter Zellvitalität. Quercetin wird im Zuge des Neutralisationsprozesses der Hydroxylradikale selbst zu toxischen Oxidationsprodukten, wie dem Quercetin-Quinon (QQ), umgewandelt. Das gebildete Oxidationsprodukt QQ ist hochreaktiv gegenüber Thiolen und reagiert mit Glutathion (GSH). Die Bindung zu GSH ist reversibel. Wenn die GSH-Konzentration niedrig ist, dissoziiert QQ wieder und reagiert mit anderen Thiolen wie z.B. den Sulfhydrylgruppen von Proteinen, woraus andere toxische Effekte resultieren. Quercetin schützt also vor dem H_2O_2 -induzierten DNA-Schaden, durch die Bildung toxischer Oxidationsprodukte bei der Reaktion von Quercetin mit Hydroxylradikalen entstehen aber andere toxische Wirkungen (Boots et al., 2007; Boots et al., 2008).

Es wäre daher eine mögliche Erklärung, dass Quercetin zwar die toxischen Wirkungen der Peroxidradikale und damit Nekrose unterdrückt, das entstehende Oxidationsprodukt aus Quercetin aber, wenn in ausreichender Konzentration vorhanden, auf direktem oder indirektem Wege Apoptose auslöst.

4.3.2 α -Tocopherol

Im Gegensatz zu Quercetin zeigte α -Tocopherol in der höchsten eingesetzten Konzentration von 50 μ M nach Exposition über 24 h keine zytotoxischen Wirkungen auf C6-Zellen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ergaben sich keine Unterschiede im Anteil apoptotischer, nekrotischer oder desintegrierter Zellen. Der Anteil apoptotischer Zellen war stets unter 1 %, der Anteil nekrotischer Zellen unter 10 %. Eine ähnlich geringe Zytotoxizität ergab sich bei Betti et al. (2006) in einer Stu-

die an murinen C6-Glioma Zellen. α -Tocopherol hat verglichen mit allen anderen Tocopherol-Isoformen die größte antioxidative Wirkung (Kayden und Traber, 1993). Dennoch zeigte die Vorinkubation mit α -Tocopherol keine protektive Wirkung bei Exposition von C6-Zellen mit einer zytotoxischen H_2O_2 -Konzentration. Dieses Ergebnis bestätigt sich durch Untersuchungen von Estany et al. (2007) an Zellen der Endometriumkarzinom-Zelllinie RL-95-2. In der Studie hatte weder die Vor- noch die Postinkubation oder die simultane Inkubation mit α -Tocopherol eine erhöhte Zellviitalität nach H_2O_2 -Behandlung zur Folge. Die Wirkungslosigkeit von α -Tocopherol bei gleichzeitiger Behandlung mit H_2O_2 zeigten auch die Untersuchungen von Osakada et al. (2003).

Im Gegensatz dazu wurden C6-Zellen, wie im Ergebnisteil beschrieben, durch Vorinkubation mit α -Tocopherol vor den zytotoxischen Wirkungen organischer Peroxide geschützt. α -Tocopherol wirkte bei Exposition mit tert-BuOOH bereits ab einer Konzentration von 1 μM , signifikant ab 5 μM , zytoprotektiv. Die zytotoxische Wirkung von 100 μM CHP wurde mit 5 μM α -Tocopherol signifikant verringert. Oberhalb von 5 μM α -Tocopherol ergaben sich weder bei CHP noch bei tert-BuOOH deutliche Steigerungen der zytoprotektiven Wirkung.

Eine mögliche Ursache für die protektive Wirkung des α -Tocopherols bei den organischen Peroxiden, nicht aber bei H_2O_2 könnte der durch die unterschiedliche Lipidlöslichkeit bedingte Wirkort der Radikale und des Antioxidans sein. Die antioxidative Wirkung des lipophilen α -Tocopherol beruht auf der Reaktion mit den Alkoxyradikalen und Peroxylradikalen mehrfach ungesättigter Fettsäuren, wodurch die Kettenreaktion der Lipidperoxidation unterbrochen werden kann. Der primäre Angriffsort für die Radikale organischer Peroxide ist die Zellmembran (Vroegop et al., 1995), während H_2O_2 entweder durch Diffusion oder durch Aquaporine die Zellmembran passiert und nach Umsetzung zum Hydroxylradikal mit nahezu allen Biomolekülen der Zelle reagieren kann (Halliwell und Gutteridge, 1985), aber keine Lipidperoxidation verursacht (Linden et al., 2008). Lipidperoxidation wird hingegen durch die lipophiler aufgebauten Radikale der organischen Peroxide, CHP und tert-BuOOH, ausgelöst. Zeitlich gesehen ist die Lipidperoxidation ein Ereignis, welches vor dem durch CHP und tert-BuOOH-induziertem Zelltod stattfindet und nach den Ergebnissen von Linden et al. (2008) und Masaki et al. (1989) ursächlich mit dem ausgelösten Zelltod in

4 Diskussion

Verbindung steht. α -Tocopherol verhindert die durch CHP-induzierte Lipidperoxidation (Linden et al., 2008) und, wie oben beschrieben, den Zelltod bei Exposition von C6-Zellen mit den organischen Peroxiden. Es wäre also eine mögliche Erklärung, dass das lipophile Antioxidans α -Tocopherol deshalb den CHP und tert-BuOOH-induzierten Zelltod verhindert, nicht aber den durch H_2O_2 , weil der Hauptwirkort von CHP, tert-BuOOH und α -Tocopherol durch deren Lipophilie bestimmt wird und daher auf die Zellmembran beschränkt ist.

Bei Exposition mit CHP und deutlicher noch bei tert-BuOOH kam es durch die Vorinkubation mit α -Tocopherol zu einer Verschiebung in den Anteilen apoptotischer und nekrotischer Zellen. Während die organischen Peroxide allein in der Hauptsache Nekrose auslösten, ergaben sich nach Vorinkubation mit α -Tocopherol vor allem bei tert-BuOOH erhöhte Anteile apoptotischer Zellen und einhergehend auch der Caspase-3-Aktivität. Die Vorinkubation mit α -Tocopherol versetzte sozusagen einen kleinen Teil der Zellpopulation in die Lage statt Nekrose den apoptotischen Zelltod einzuleiten. Für die Einleitung von Apoptose waren bei Exposition mit tert-BuOOH 1 μ M α -Tocopherol, bei Exposition mit CHP 5 μ M ausreichend. Die prozentualen Anteile apoptotischer Zellen veränderten sich mit Erhöhung der α -Tocopherol-Konzentration nur unwesentlich. Bei CHP betrugen diese im Mittel 1,5 %, bei tert-BuOOH 10,6 %.

Miyoshi et al. (2005) berichteten, dass die Vorinkubation mit α -Tocopherol in zahlreichen Zelllinien zu einer Steigerung der Caspase-3-Proteinexpression führt und damit die Einleitung von Apoptose nach Behandlung mit apoptoseauslösenden Substanzen fördert. In dieser Studie waren sowohl die Anteile apoptotischer Zellen als auch die Caspase-3-Aktivität nach Vorinkubation mit α -Tocopherol und anschließender Exposition mit Etoposide, FAS oder H_2O_2 größer als ohne Vorinkubation.

4.4 Wirkungen von kontinuierlichem oxidativen Stress

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, auf welche Weise C6-Zellen sterben, wenn diese mit Peroxiden in verschiedenen Konzentrationen und über unterschiedliche Expositionszeiträume behandelt werden. Je nach chemischen Eigenschaften des Peroxids und den oben genannten Parametern ergaben sich Unterschiede im ROS-induzierten Zelltod. So wurde durch H_2O_2 in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit in der Hauptsache Nekrose, aber in einem kleinen Teil der Zellpopulation von C6-Zellen auch Apoptose induziert. Bei diesen Untersuchungen wurde H_2O_2 als Bolus auf die Zellen gegeben, so dass die Zellen zunächst relativ hohen Konzentrationen ausgesetzt gewesen sind. Diese hohen Konzentrationen nach Bolusgabe sinken in Abhängigkeit von den Fähigkeiten der Zellen, das Peroxid abzubauen, sehr schnell ab und sind innerhalb kurzer Zeit im Medium nicht mehr nachweisbar (Dringen und Hamprecht, 1997; Gülden et al., 2010). Diese Vorgehensweise spiegelt nicht die In-vivo-Verhältnisse wieder. In vivo findet eine kontinuierliche Produktion von H_2O_2 statt. Die Produktionsraten sind abhängig vom Zelltyp und die Steady state level liegen im nanomolaren Bereich (Barbouti et al., 2002). Somit würden durch die Behandlung der C6-Zellen mit kontinuierlich vorhandenem H_2O_2 im Gegensatz zu der Bolus-Gabe physiologischere Bedingungen simuliert. Ziel war es daher herauszufinden, wie sich C6-Zellen in Gegenwart kontinuierlich vorhandener H_2O_2 -Spiegel verhalten und welcher Zelltod in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit durch kontinuierlichen, oxidativen Stress ausgelöst wird.

Um konstante H_2O_2 -Spiegel herzustellen, wurde das Enzym Glucoseoxidase verwendet, welches aus der im Medium vorhandenen Glucose H_2O_2 bildet. In Abwesenheit von Zellen stieg die H_2O_2 -Konzentration nahezu linear im Medium in Abhängigkeit von der eingesetzten Glucoseoxidase-Konzentration über die Zeit an. Maßgeblich für die vorhandene H_2O_2 -Konzentration im Medium war also in Abwesenheit von Zellen die Glucoseoxidase-Konzentration und die Reaktionszeit. Wurden C6-Zellen zusammen mit Glucoseoxidase im Medium inkubiert ergaben sich nach etwa 60 min konstante H_2O_2 -Spiegel im Medium. Bei der Bildung dieser H_2O_2 -Spiegel spielen vermutlich zwei Prozesse eine Rolle, zum einen die Bildung von H_2O_2 durch das Enzym

4 Diskussion

Glucoseoxidase und zum anderen der Abbau von H_2O_2 durch Gluthathionperoxidase und Katalase. Mit Erhöhung der Glucoseoxidase-Konzentration stellten sich auch höhere H_2O_2 -Spiegel im Medium ein. Diese betrugen im Mittel bei 0,1; 0,2; 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Glucoseoxidase 6 μM ; 31 μM bzw. 110 μM . Bei 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Glucoseoxidase wurden noch keine messbaren H_2O_2 -Konzentrationen im Medium gebildet. Dies zeigt, dass die Höhe der H_2O_2 -Spiegel abhängig ist von der eingesetzten Glucoseoxidase-Konzentration, aber auch, wie Hirrlinger et al. (1999) in einem Protokoll mit einem anderen H_2O_2 -produzierenden System (Xanthin-Oxidase und Superoxid-Dismutase) beschrieben, von der Fähigkeit der Zellen abhängt, das Peroxid abzubauen. Die Abbaukapazität müsste wiederum von der Zellkonzentration abhängig sein, was aufgrund einer zu kleinen Versuchszahl nur vermutet werden konnte, sich jetzt aber in Versuchen aus unserem Labor bestätigt hat (Gülden et al., 2010). Bei einer niedrigeren Zellkonzentration würde sich somit höchstwahrscheinlich, eine höhere Steady-State-Konzentration einstellen.

Das durch die Glucoseoxidase kontinuierlich produzierte H_2O_2 führte konzentrations- und zeitabhängig zu einer Abnahme der Zellvitalität. Dies ergab sich aus Addition der Anteile nekrotischer, apoptotischer und desintegrierter Zellen zu einem Gesamtanteil toter Zellen. Danach waren bei der höchsten eingesetzten Glucoseoxidase-Konzentration von 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nach 24 h alle Zellen tot. In den niedrigeren Konzentrationen verringerten sich die zytotoxischen Wirkungen konzentrationsabhängig. Bei 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Glucoseoxidase waren auch nach 24 h keine zytotoxischen Wirkungen erkennbar.

Um herauszufinden auf welche Art und Weise C6-Zellen unter Bedingungen von kontinuierlichem oxidativen Stress sterben, wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Anfärbung mit Hoechst 33342 und Propidiumjodid fluoreszenzmikroskopisch analysiert. In Abhängigkeit von der eingesetzten Glucoseoxidase-Konzentration und der Expositionszeit kam es zu einem Anstieg im Anteil nekrotischer Zellen, kenntlich an den durch Propidiumjodid rot gefärbten und häufig vergrößerten Kernen. Zu keinem Zeitpunkt und bei keiner Konzentration wurde Zelltod durch Apoptose beobachtet. Dies wurde durch Messungen der Caspase-3-Aktivität bestätigt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ergab sich keine auf Apoptose hinweisende Aktivitätssteigerung, sondern mit zunehmender Konzentration und Expositionsdauer ein

nahezu vollständiger Aktivitätsverlust. Je höher die sich einstellende Steady-State-Konzentration, desto schneller wurde der nekrotische Zelltod in einem bestimmten Teil der Zellpopulation eingeleitet. Ebenso wurde das Ausmaß des vom nekrotischen Zelltod betroffenen Teils der Zellpopulation durch die Höhe der Glucoseoxidase-Konzentration bestimmt. Dem Anstieg nekrotischer Zellen folgend erhöhte sich der Anteil desintegrierter Zellen. Ein Indiz dafür, dass die sich im Stadium der Nekrose befindlichen Zellen mit zunehmender Expositionsdauer lysieren und somit bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse nicht erfasst wurden. Kontinuierlich vorhandener oxidativer Stress verursacht in C6-Zellen im Gegensatz zur Bolus-Gabe ausschließlich nekrotischen Zelltod.

Barbouti et al. (2002) beschrieben, dass nur die H_2O_2 -Bolus-Gabe in Jurkat-Zellen Apoptose hervorrief. Bei der Bolus-Gabe von $150 \mu\text{M}$ H_2O_2 wurden typische den apoptotischen Zelltod kennzeichnende Merkmale wie DNA-Fragmentation, Caspase-Aktivierung und PARP-Spaltung nachgewiesen, während der Zelltod bei kontinuierlicher Gabe von H_2O_2 ($2,0 \mu\text{M}$ pro Minute) durch keines dieser Merkmale gekennzeichnet war. Die kontinuierliche Produktion von H_2O_2 hemmte bei den Jurkat-Zellen ähnlich wie bei den C6-Zellen die Caspase-3-Aktivierung. Eine mögliche Ursache wäre, wie Hampton und Orrenius (1997) vermuteten, die oxidative Inaktivierung der Caspasen, die unter Bedingungen einer kontinuierlichen Produktion von H_2O_2 im Gegensatz zur Bolusgabe nicht reversibel ist. Durch die kontinuierliche Gabe von H_2O_2 würden die antioxidativen Systeme der Zellen durch fortwährenden Verbrauch auf niedrigem Niveau gehalten. Möglich ist, dass hierdurch die für die Aktivität der Caspasen nötigen, reduzierenden Bedingungen (Chandra et al., 2000) nicht wieder hergestellt werden können, was aber bei der Bolus-Gabe geschieht.

Zu dieser Hypothese passend ergab sich bei den Versuchen mit C6-Zellen bei 100 bzw. $200 \mu\text{M}$ H_2O_2 Bolusgabe nach 24 h ein Anstieg in der Caspase-3-Aktivität und gleichzeitig eine Erhöhung im prozentualen Anteil apoptotischer Zellen. Aus den Versuchen mit Staurosporin wissen wir, dass die Aktivierung der Caspasen in C6-Zellen aber bereits nach 4 h erfolgen kann. Die Aktivierung der Caspasen nach H_2O_2 -Bolusgabe wäre somit zeitverzögert. Dies ist möglicherweise bedingt durch eine reversible Inaktivierung der Caspasen. Bei kontinuierlicher H_2O_2 -Gabe ist we-

4 Diskussion

der ein Anstieg der Caspaseaktivität nachweisbar noch morphologisch apoptotische Kerne erkennbar, so dass hier eine dauerhafte Inaktivierung der Caspasen postuliert werden könnte. Barbouti et al. (2007) beschrieben, dass bei der kontinuierlichen Produktion von H_2O_2 durch Glucosoxidase entstandenen Plasmaspiegel von 0,02 bis 2,0 $\text{H}_2\text{O}_2 \mu\text{M}/\text{min}$ keine Aktivierung der Caspasen 9, 7 und 3 bewirkten. Die Apoptose-Kaskade wurde vor der Aktivierung der Caspase-9 unterbrochen. Alle vor der Aktivierung der Caspase-9 ablaufenden Prozesse wie die Cytochrom c-Freisetzung aus dem Mitochondrium und die Bildung des Apoptosomenkomplexes einschließlich der Bindung von Procaspase-9 fanden statt. Auch Barbouti et al. (2007) vermuten, dass unter den fehlenden reduzierenden Bedingungen bei kontinuierlicher Anwesenheit von H_2O_2 die Oxidation der sensiblen Cysteinreste im reaktiven Zentrum der Caspasen stattfindet. Allerdings beobachteten Barbouti et al. (2007) bei Jurkatzellen die für Apoptose typische Chromatinkondensation und postulierten daher einen Caspase unabhängigen Mechanismus unter Beteiligung von AIF.

Bei den C6-Zellen wurde zu keinem Expositionszeitpunkt Chromatinkondensation beobachtet. Daher wird hier nach wie vor von einem nekrotischen Zelltod bei kontinuierlicher Exposition mit H_2O_2 ausgegangen. Vermutlich spielt auch hier der ATP-Status der Zelle eine entscheidende Rolle. Ob Zellen durch eine zytotoxische Substanz durch Apoptose oder Nekrose sterben, wird durch den ATP-Status der Zelle beeinflusst. Apoptose ist ein aktiver, ATP verbrauchender Prozess (Lelli et al., 1998, Kass et al., 1996). Der Zelltod kann in Gegenwart einer eigentlich Apoptose-auslösenden Substanz zur Nekrose verschoben werden, wenn nicht genügend intrazelluläres ATP vorhanden ist (Leist et al., 1997). Lee und Shacter (1999) beschrieben, dass die FAS-vermittelte Apoptose durch H_2O_2 sowohl in Jurkat- als auch in Burkitt's Lymphoma-Zellen nicht eingeleitet wurde. Gleichzeitig wurde ein massiver Abfall im ATP-Spiegel beobachtet. Wurde der durch H_2O_2 ausgelöste Abfall des ATP-Spiegels verhindert, starben die Zellen einen apoptotischen Zelltod. Möglicherweise führt die kontinuierliche Exposition von C6-Zellen mit H_2O_2 neben der oxidativen Inaktivierung der Caspasen zu einer Entleerung der ATP-Speicher. Daher wäre unter diesen Bedingungen nur ein nekrotischer Zelltod möglich.

Zusammenfassend gesagt bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die von Giorgio et al. (2007) formulierte Aussage zu der Wirkung von H_2O_2 als „direct and potent

4 Diskussion

inducer of apoptosis“ nicht. Nach der Bolusgabe von H_2O_2 wurde zwar in einem kleinen Teil der Zellpopulation zeitverzögert und nur in einem schmalen Konzentrationsfenster Zelltod durch Apoptose eingeleitet, in der Hauptsache starben C6-Zellen jedoch durch Nekrose. In-vivo Bedingungen, die in geeigneterer Weise durch eine kontinuierliche Produktion von H_2O_2 simuliert werden, führten ausschließlich zum Zelltod durch Nekrose. Tatsächlich wird Apoptose in bestimmten H_2O_2 -Konzentrationen eingeleitet, doch ist das Ausmaß so gering, dass der Zelltod durch Apoptose nicht wie bei Giorgio et al. (2007) als eine dominierende, biologische Wirkung bestimmter H_2O_2 -Konzentrationen angesehen werden kann.

Literaturverzeichnis

- Abe, K. und Saito, H.: Characterization of t-butyl hydroperoxide toxicity in cultured rat cortical neurones and astrocytes., *Pharmacol Toxicol*, 83, 40–46, 1998.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., und Akey, C. W.: Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation., *Mol Cell*, 9, 423–432, 2002.
- Albano, E., Bellomo, G., Parola, M., Carini, R., und Dianzani, M. U.: Stimulation of lipid peroxidation increases the intracellular calcium content of isolated hepatocytes., *Biochim Biophys Acta*, 1091, 310–316, 1991.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., und Yuan, J.: Human ICE/CED-3 protease nomenclature., *Cell*, 87, 171, 1996.
- Amano, S., Ohashi, M., Kirihaara, M., Yang, X. H., und Hazama, F.: alpha-Tocopherol protects against radical-induced injury in cultured neurons., *Neurosci Lett*, 170, 55–58, 1994.
- Andersson, M., Sjöstrand, J., Petersen, A., Honarvar, A. K., und Karlsson, J. O.: Caspase and proteasome activity during staurosporin-induced apoptosis in lens epithelial cells., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 2623–2632, 2000.
- Balaban, R. S., Nemoto, S., und Finkel, T.: Mitochondria, oxidants, and aging., *Cell*, 120, 483–495, doi:10.1016/j.cell.2005.02.001, 2005.
- Barbouti, A., Doulias, P.-T., Nouis, L., Tenopoulou, M., und Galaris, D.: DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H₂O₂., *Free Radic Biol Med*, 33, 691–702, 2002.

- Barbouti, A., Amorgianiotis, C., Kolettas, E., Kanavaros, P., und Galaris, D.: Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating procaspase-9 in an iron-dependent manner., *Free Radic Biol Med*, 43, 1377–1387, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.020, 2007.
- Barth, R. F. und Kaur, B.: Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas., *J Neurooncol*, 94, 299–312, doi:10.1007/s11060-009-9875-7, 2009.
- Belmokhtar, C. A., Hillion, J., und Ségal-Bendirdjian, E.: Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms., *Oncogene*, 20, 3354–3362, doi:10.1038/sj.onc.1204436, 2001.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., und Sweet, W.: Differentiated rat glial cell strain in tissue culture., *Science*, 161, 370–371, 1968.
- Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K. W., und Pommier, Y.: Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine., *Exp Cell Res*, 211, 314–321, doi:10.1006/excr.1994.1093, 1994.
- Betti, M., Minelli, A., Canonico, B., Castaldo, P., Magi, S., Aisa, M. C., Piroddi, M., Tomaso, V. D., und Galli, F.: Antiproliferative effects of tocopherols (vitamin E) on murine glioma C6 cells: homologue-specific control of PKC/ERK and cyclin signaling., *Free Radic Biol Med*, 41, 464–472, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.012, 2006.
- Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., und Jahn, T. P.: Membrane transport of hydrogen peroxide., *Biochim Biophys Acta*, 1758, 994–1003, doi:10.1016/j.bbamem.2006.02.015, 2006.
- Boots, A. W., Li, H., Schins, R. P. F., Duffin, R., Heemskerk, J. W. M., Bast, A., und Haenen, G. R. M. M.: The quercetin paradox., *Toxicol Appl Pharmacol*, 222, 89–96, doi:10.1016/j.taap.2007.04.004, 2007.
- Boots, A. W., Haenen, G. R. M. M., und Bast, A.: Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical., *Eur J Pharmacol*, 585, 325–337, doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.008, 2008.

- Borutaite, V. und Brown, G. C.: Caspases are reversibly inactivated by hydrogen peroxide., *FEBS Lett*, 500, 114–118, 2001.
- Brenner, S., Gülden, M., Maser, E., und Seibert, H.: Lasting effect of preceding culture conditions on the susceptibility of C6 cells to peroxide-induced oxidative stress., *Toxicol In Vitro*, doi:10.1016/j.tiv.2010.06.005, 2010.
- Burdon, R. H.: Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation., *Free Radic Biol Med*, 18, 775–794, 1995.
- Burlacu, A., Jinga, V., Gafencu, A. V., und Simionescu, M.: Severity of oxidative stress generates different mechanisms of endothelial cell death., *Cell Tissue Res*, 306, 409–416, doi:10.1007/s004410100424, 2001.
- Butterfield, D. A., Drake, J., Pocernich, C., und Castegna, A.: Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide., *Trends Mol Med*, 7, 548–554, 2001.
- Chae, H. J., Kang, J. S., Byun, J. O., Han, K. S., Kim, D. U., Oh, S. M., Kim, H. M., Chae, S. W., und Kim, H. R.: Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts., *Pharmacol Res*, 42, 373–381, doi:10.1006/phrs.2000.0700, 2000.
- Chandra, J., Samali, A., und Orrenius, S.: Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress., *Free Radic Biol Med*, 29, 323–333, 2000.
- Chen, D., Daniel, K. G., Chen, M. S., Kuhn, D. J., Landis-Piwowar, K. R., und Dou, Q. P.: Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells., *Biochem Pharmacol*, 69, 1421–1432, doi:10.1016/j.bcp.2005.02.022, 2005.
- Cohen, J. J.: Apoptosis., *Immunol Today*, 14, 126–130, 1993.
- Coles, H. S., Burne, J. F., und Raff, M. C.: Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor., *Development*, 118, 777–784, 1993.

- Cookson, M. R., Slamon, N. D., und Pentreath, V. W.: Glutathione modifies the toxicity of triethyltin and trimethyltin in C6 glioma cells., *Arch Toxicol*, 72, 197–202, 1998.
- Coon, M. J., Vaz, A. D., und Bestervelt, L. L.: Cytochrome P450 2: peroxidative reactions of diversozymes., *FASEB J*, 10, 428–434, 1996.
- Davies, D. L. und Vernadakis, A.: Responses in astrocytic C6 glioma cells to ethanol and dibutyl cyclic AMP., *Brain Res*, 389, 253–260, 1986.
- Davies, K. J.: The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress., *IUBMB Life*, 48, 41–47, doi:10.1080/713803463, 1999.
- Deckwerth, T. L. und Johnson, E. M.: Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor., *J Cell Biol*, 123, 1207–1222, 1993.
- Degterev, A. und Yuan, J.: Expansion and evolution of cell death programmes., *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 378–390, doi:10.1038/nrm2393, 2008.
- Desagher, S., Glowinski, J., und Premont, J.: Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity., *J Neurosci*, 16, 2553–2562, 1996.
- Dringen, R. und Hamprecht, B.: Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells., *Brain Res*, 759, 67–75, 1997.
- Dringen, R., Kussmaul, L., und Hamprecht, B.: Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by microtiter plate assay., *Brain Res Brain Res Protoc*, 2, 223–228, 1998.
- Dringen, R., Kussmaul, L., Gutterer, J. M., Hirrlinger, J., und Hamprecht, B.: The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells., *J Neurochem*, 72, 2523–2530, 1999.
- Duke, R. C.: Methods of analyzing chromatin changes accompanying apoptosis of target cells in killer cell assays., *Methods Mol Biol*, 282, 43–66, doi:10.1385/1-59259-812-9:043, 2004.

- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., und Nagata, S.: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD., *Nature*, 391, 43–50, doi:10.1038/34112, 1998.
- Estany, S., Palacio, J. R., Barnadas, R., Sabes, M., Iborra, A., und Martínez, P.: Antioxidant activity of N-acetylcysteine, flavonoids and alpha-tocopherol on endometrial cells in culture., *J Reprod Immunol*, 75, 1–10, doi:10.1016/j.jri.2007.01.007, 2007.
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., und Cooke, M. S.: Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance., *Mutat Res*, 567, 1–61, doi:10.1016/j.mrrev.2003.11.001, 2004.
- Falcieri, E., Martelli, A. M., Bareggi, R., Cataldi, A., und Cocco, L.: The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation., *Biochem Biophys Res Commun*, 193, 19–25, doi:10.1006/bbrc.1993.1584, 1993.
- Fridovich, I.: Superoxide anion radical $O_2^{\bullet-}$, superoxide dismutases, and related matters., *J Biol Chem*, 272, 18 515–18 517, 1997.
- Gardner, A. M., Xu, F. H., Fady, C., Jacoby, F. J., Duffey, D. C., Tu, Y., und Lichtenstein, A.: Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide., *Free Radic Biol Med*, 22, 73–83, 1997.
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., und Pelicci, P. G.: Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 722–728, doi:10.1038/nrm2240, 2007.
- Gülden, M., Jess, A., Kammann, J., Maser, E., und Seibert, H.: Cytotoxic potency of H_2O_2 in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time., *Free Radic Biol Med*, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.015, 2010.
- Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C., und Perez, J. M.: Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?, *Mol Pharmacol*, 59, 657–663, 2001.

- Gorman, A. M., Hirt, U. A., Orrenius, S., und Ceccatelli, S.: Dexamethasone pretreatment interferes with apoptotic death in glioma cells., *Neuroscience*, 96, 417–425, 2000.
- Grobben, B., Deyn, P. P. D., und Slegers, H.: Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion., *Cell Tissue Res*, 310, 257–270, doi:10.1007/s00441-002-0651-7, 2002.
- Haidara, K., Morel, I., Abalea, V., Barre, M. G., und Denizeau, F.: Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum., *Biochim Biophys Acta*, 1542, 173–185, 2002.
- Halliwell, B.: Antioxidant characterization. methodology and mechanism., *Biochem Pharmacol*, 49, 1341–1348, 1995.
- Halliwell, B. und Chirico, S.: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance., *Am J Clin Nutr*, 57, 715S–724S; discussion 724S–725S, 1993.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J. M.: The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases., *Mol Aspects Med*, 8, 89–193, 1985.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J. M.: Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. an update., *FEBS Lett*, 307, 108–112, 1992.
- Halliwell, B. und Whiteman, M.: Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *Br J Pharmacol*, 142, 231–255, doi:10.1038/sj.bjp.0705776, 2004.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M.: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, 2007.
- Hampton, M. B. und Orrenius, S.: Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis., *FEBS Lett*, 414, 552–556, 1997.
- Hirrlinger, J., Hamprecht, B., und Dringen, R.: Application and modulation of a permanent hydrogen peroxide-induced oxidative stress to cultured astroglial cells., *Brain Res Brain Res Protoc*, 4, 223–229, 1999.

- Hix, S., Kadiiska, M. B., Mason, R. P., und Augusto, O.: In vivo metabolism of tert-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies., *Chem Res Toxicol*, 13, 1056–1064, 2000.
- Jarpe, M. B., Widmann, C., Knall, C., Schlesinger, T. K., Gibson, S., Yujiri, T., Fanger, G. R., Gelfand, E. W., und Johnson, G. L.: Anti-apoptotic versus pro-apoptotic signal transduction: checkpoints and stop signs along the road to death., *Oncogene*, 17, 1475–1482, doi:10.1038/sj.onc.1202183, 1998.
- Jarvis, W. D., Turner, A. J., Povirk, L. F., Traylor, R. S., und Grant, S.: Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C., *Cancer Res*, 54, 1707–1714, 1994.
- Jiang, Z. Y., Woollard, A. C., und Wolff, S. P.: Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation., *FEBS Lett*, 268, 69–71, 1990.
- Kanno, S., Ishikawa, M., Takayanagi, M., Takayanagi, Y., und Sasaki, K.: Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes., *Biol Pharm Bull*, 22, 1296–1300, 1999.
- Kanupriya, Prasad, D., Ram, M. S., Sawhney, R. C., Ilavazhagan, G., und Banerjee, P. K.: Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced cytotoxicity in U-937 macrophages by alteration of mitochondrial function and generation of ros., *Toxicol In Vitro*, 21, 846–854, doi:10.1016/j.tiv.2007.02.007, 2007.
- Karlsson, J., Engard, M., Brundin, P., und Burkitt, M. J.: trans-resveratrol protects embryonic mesencephalic cells from tert-butyl hydroperoxide: electron paramagnetic resonance spin trapping evidence for a radical scavenging mechanism., *J Neurochem*, 75, 141–150, 2000.
- Kass, G. E., Eriksson, J. E., Weis, M., Orrenius, S., und Chow, S. C.: Chromatin condensation during apoptosis requires ATP., *Biochem J*, 318 (Pt 3), 749–752, 1996.
- Kayden, H. J. und Traber, M. G.: Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans., *J Lipid Res*, 34, 343–358, 1993.

- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., und Currie, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics., *Br J Cancer*, 26, 239–257, 1972.
- Köhler, C., Orrenius, S., und Zhivotovsky, B.: Evaluation of caspase activity in apoptotic cells., *J Immunol Methods*, 265, 97–110, 2002.
- Koh, J. Y., Wie, M. B., Gwag, B. J., Sensi, S. L., Canzoniero, L. M., Demaro, J., Csernansky, C., und Choi, D. W.: Staurosporine-induced neuronal apoptosis., *Exp Neurol*, 135, 153–159, doi:10.1006/exnr.1995.1074, 1995.
- Kruman, I., Guo, Q., und Mattson, M. P.: Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells., *J Neurosci Res*, 51, 293–308, 1998.
- Latt, S. A. und Stetten, G.: Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis., *J Histochem Cytochem*, 24, 24–33, 1976.
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., und Bondy, S. C.: Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress., *Chem Res Toxicol*, 5, 227–231, 1992.
- Lee, Y. J. und Shacter, E.: Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells., *J Biol Chem*, 274, 19 792–19 798, 1999.
- Lee, Y. W., Ha, M. S., und Kim, Y. K.: H₂O₂ -induced cell death in human glioma cells: role of lipid peroxidation and PARP activation., *Neurochem Res*, 26, 337–343, 2001.
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, S., und Nicotera, P.: Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis., *J Exp Med*, 185, 1481–1486, 1997.
- Lelli, J. L., Becks, L. L., Dabrowska, M. I., und Hinshaw, D. B.: ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells., *Free Radic Biol Med*, 25, 694–702, 1998.

- Lemasters, J. J., Qian, T., Bradham, C. A., Brenner, D. A., Cascio, W. E., Trost, L. C., Nishimura, Y., Nieminen, A. L., und Herman, B.: Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death., *J Bioenerg Biomembr*, 31, 305–319, 1999.
- Lennon, S. V., Martin, S. J., und Cotter, T. G.: Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli., *Cell Prolif*, 24, 203–214, 1991.
- Linden, A., Gülden, M., Martin, H.-J., Maser, E., und Seibert, H.: Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells., *Toxicol In Vitro*, 22, 1371–1376, doi:10.1016/j.tiv.2008.02.003, 2008.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., und RANDALL, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent., *J Biol Chem*, 193, 265–275, 1951.
- Lucas, M., Sánchez-Margalet, V., Sanz, A., und Solano, F.: Protein kinase C activation promotes cell survival in mature lymphocytes prone to apoptosis., *Biochem Pharmacol*, 47, 667–672, 1994.
- Masaki, N., Kyle, M. E., und Farber, J. L.: tert-butyl hydroperoxide kills cultured hepatocytes by peroxidizing membrane lipids., *Arch Biochem Biophys*, 269, 390–399, 1989.
- Meller, R., Skradski, S. L., Simon, R. P., und Henshall, D. C.: Expression, proteolysis and activation of caspases 6 and 7 during rat C6 glioma cell apoptosis., *Neurosci Lett*, 324, 33–36, 2002.
- Miyoshi, N., Naniwa, K., Kumagai, T., Uchida, K., Osawa, T., und Nakamura, Y.: Alpha-tocopherol-mediated caspase-3 up-regulation enhances susceptibility to apoptotic stimuli., *Biochem Biophys Res Commun*, 334, 466–473, doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.113, 2005.
- Nguyen, T. T. T., Tran, E., Nguyen, T. H., Do, P. T., Huynh, T. H., und Huynh, H.: The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells., *Carcinogenesis*, 25, 647–659, doi:10.1093/carcin/bgh052, 2004.

- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., und Lazebnik, Y. A.: Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis., *Nature*, 376, 37–43, doi:10.1038/376037a0, 1995.
- Nicotera, P., Leist, M., und Ferrando-May, E.: Apoptosis and necrosis: different execution of the same death., *Biochem Soc Symp*, 66, 69–73, 1999.
- Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchya, H., Takahashi, Y., und Masuma, R.: A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin. taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization., *J Antibiot (Tokyo)*, 30, 275–282, 1977.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., und Nicotera, P.: Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link., *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 552–565, doi:10.1038/nrm1150, 2003.
- Osakada, F., Hashino, A., Kume, T., Katsuki, H., Kaneko, S., und Akaike, A.: Neuroprotective effects of alpha-tocopherol on oxidative stress in rat striatal cultures., *Eur J Pharmacol*, 465, 15–22, 2003.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., und Zhivotovsky, B.: Mitochondria, oxidative stress and cell death., *Apoptosis*, 12, 913–922, doi:10.1007/s10495-007-0756-2, 2007.
- Palomba, L., Brambilla, L., Brandi, G., Sestili, P., Cattabeni, F., und Cantoni, O.: Low levels of hydrogen peroxide and L-histidine induce DNA double-strand breakage and apoptosis., *Eur J Pharmacol*, 318, 167–173, 1996.
- Park, S., Kim, A. J., und Lee, M.: Synergic effects of alpha-tocopherol and beta-carotene on tert-butylhydroperoxide-induced HepG2 cell injury., *Toxicol Ind Health*, 25, 311–320, doi:10.1177/0748233709106443, 2009.
- Peter, M. E. und Krammer, P. H.: Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis., *Curr Opin Immunol*, 10, 545–551, 1998.
- Pocernich, C. B., Cardin, A. L., Racine, C. L., Lauderback, C. M., und Butterfield, D. A.: Glutathione elevation and its protective role in acrolein-induced protein

- damage in synaptosomal membranes: relevance to brain lipid peroxidation in neurodegenerative disease., *Neurochem Int*, 39, 141–149, 2001.
- Porter, A. G. und Jänicke, R. U.: Emerging roles of caspase-3 in apoptosis., *Cell Death Differ*, 6, 99–104, doi:10.1038/sj.cdd.4400476, 1999.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., und Paganga, G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids., *Free Radic Biol Med*, 20, 933–956, 1996.
- Richter, C.: Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes., *Chem Phys Lipids*, 44, 175–189, 1987.
- Robertson, J. D. und Orrenius, S.: Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals., *Crit Rev Toxicol*, 30, 609–627, doi:10.1080/10408440008951122, 2000.
- Russo, M., Palumbo, R., Tedesco, I., Mazzearella, G., Russo, P., Iacomino, G., und Russo, G. L.: Quercetin and anti-CD95(Fas/Apo1) enhance apoptosis in HPB-ALL cell line., *FEBS Lett*, 462, 322–328, 1999.
- Rüweler, M., Anker, A., Gülden, M., Maser, E., und Seibert, H.: Inhibition of peroxide-induced radical generation by plant polyphenols in C6 astrogloma cells., *Toxicol In Vitro*, 22, 1377–1381, doi:10.1016/j.tiv.2008.02.019, 2008.
- Rüweler, M., Gülden, M., Maser, E., Murias, M., und Seibert, H.: Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant activities of resveratrol and analogues in C6 astrogloma cells in vitro., *Chem Biol Interact*, 182, 128–135, doi:10.1016/j.cbi.2009.09.003, 2009.
- Saito, Y., Nishio, K., Ogawa, Y., Kimata, J., Kinumi, T., Yoshida, Y., Noguchi, N., und Niki, E.: Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide., *Free Radic Res*, 40, 619–630, doi:10.1080/10715760600632552, 2006.
- Saleh, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R., und Alnemri, E. S.: Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation., *J Biol Chem*, 274, 17 941–17 945, 1999.

- Savill, J. S., Henson, P. M., und Haslett, C.: Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism., *J Clin Invest*, 84, 1518–1527, doi:10.1172/JCI114328, 1989.
- Scalbert, A. und Williamson, G.: Dietary intake and bioavailability of polyphenols., *J Nutr*, 130, 2073S–2085S, 2000.
- Schraufstatter, I. U., Hinshaw, D. B., Hyslop, P. A., Spragg, R. G., und Cochrane, C. G.: Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide., *J Clin Invest*, 77, 1312–1320, doi:10.1172/JCI112436, 1986.
- Seibert, H., Mörchel, S., und Gülden, M.: Cytotoxic potency of trialkyltins to C6 glioma cells in vitro: impact of exposure conditions., *Cell Biol Toxicol*, 20, 273–283, 2004.
- Shih, C.-M., Lin, H., Liang, Y.-C., Lee, W.-S., Bi, W.-F., und Juan, S.-H.: Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells., *Eur J Pharmacol*, 496, 41–48, doi:10.1016/j.ejphar.2004.06.016, 2004.
- Sies, H.: Oxidative stress: from basic research to clinical application., *Am J Med*, 91, 31S–38S, 1991.
- Slee, E. A., Adrain, C., und Martin, S. J.: Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis., *J Biol Chem*, 276, 7320–7326, doi:10.1074/jbc.M008363200, 2001.
- Stadtman, E. R.: Protein oxidation and aging., *Free Radic Res*, 40, 1250–1258, doi:10.1080/10715760600918142, 2006.
- Subramaniam, R., Roediger, F., Jordan, B., Mattson, M. P., Keller, J. N., Waeg, G., und Butterfield, D. A.: The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins., *J Neurochem*, 69, 1161–1169, 1997.

- Taffe, B. G., Takahashi, N., Kensler, T. W., und Mason, R. P.: Generation of free radicals from organic hydroperoxide tumor promoters in isolated mouse keratinocytes. formation of alkyl and alkoxyl radicals from tert-butyl hydroperoxide and cumene hydroperoxide., *J Biol Chem*, 262, 12 143–12 149, 1987.
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., und Tomita, F.: Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{2+} -dependent protein kinase., *Biochem Biophys Res Commun*, 135, 397–402, 1986.
- Vaux, D. L. und Strasser, A.: The molecular biology of apoptosis., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2239–2244, 1996.
- Veal, E. A., Day, A. M., und Morgan, B. A.: Hydrogen peroxide sensing and signaling., *Mol Cell*, 26, 1–14, doi:10.1016/j.molcel.2007.03.016, 2007.
- Vimard, F., Nouvelot, A., und Duval, D.: Cytotoxic effects of an oxidative stress on neuronal-like pheochromocytoma cells (PC12)., *Biochem Pharmacol*, 51, 1389–1395, 1996.
- Vroegop, S. M., Decker, D. E., und Buxser, S. E.: Localization of damage induced by reactive oxygen species in cultured cells., *Free Radic Biol Med*, 18, 141–151, 1995.
- Wang, H. und Joseph, J. A.: Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader., *Free Radic Biol Med*, 27, 612–616, 1999.
- Wang, I. K., Lin-Shiau, S. Y., und Lin, J. K.: Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells., *Eur J Cancer*, 35, 1517–1525, 1999.
- Waring, M. J.: Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids., *J Mol Biol*, 13, 269–282, 1965.
- Whittemore, E. R., Loo, D. T., und Cotman, C. W.: Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons., *Neuroreport*, 5, 1485–1488, 1994.

- Whittemore, E. R., Loo, D. T., Watt, J. A., und Cotman, C. W.: A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture., *Neuroscience*, 67, 921–932, 1995.
- Wong, C. M., Wong, K. H., und Chen, X. D.: Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications., *Appl Microbiol Biotechnol*, 78, 927–938, doi:10.1007/s00253-008-1407-4, 2008.
- Wätjen, W., Michels, G., Steffan, B., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Tran-Thi, Q.-H., Proksch, P., und Kahl, R.: Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis., *J Nutr*, 135, 525–531, 2005.
- Wyllie, A. H.: Apoptosis: an overview., *Br Med Bull*, 53, 451–465, 1997.
- Yue, T. L., Wang, C., Romanic, A. M., Kikly, K., Keller, P., DeWolf, W. E., Hart, T. K., Thomas, H. C., Storer, B., Gu, J. L., Wang, X., und Feuerstein, G. Z.: Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: A potential role of caspase-3., *J Mol Cell Cardiol*, 30, 495–507, 1998.
- Zecca, L., Youdim, M. B. H., Riederer, P., Connor, J. R., und Crichton, R. R.: Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders., *Nat Rev Neurosci*, 5, 863–873, doi:10.1038/nrn1537, 2004.
- Zhang, X.-M., Chen, J., Xia, Y.-G., und Xu, Q.: Apoptosis of murine melanoma B16-B16 cells induced by quercetin targeting mitochondria, inhibiting expression of PKC-alpha and translocating PKC-delta., *Cancer Chemother Pharmacol*, 55, 251–262, doi:10.1007/s00280-004-0863-5, 2005.
- Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L., und Davies, K. J.: The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase., *J Biol Chem*, 265, 16 330–16 336, 1990.
- Zhao, K., Luo, G., Giannelli, S., und Szeto, H. H.: Mitochondria-targeted peptide prevents mitochondrial depolarization and apoptosis induced by tert-butyl hydroperoxide in neuronal cell lines., *Biochem Pharmacol*, 70, 1796–1806, doi:10.1016/j.bcp.2005.08.022, 2005.

Literaturverzeichnis

Zielinska, M., Gülden, M., und Seibert, H.: Effects of quercetin and quercetin-3-o-glycosides on oxidative damage in rat C6 glioma cells, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13 (1), 47–53, 2003.

Vorträge und Poster

Abstracts der Vorträge

M. Perle, M. Gülden, E. Maser, S. Mörchel and H. Seibert:

Peroxide-induced oxidative stress causes predominantly necrotic cell death in C6 astrogloma cells. 25th Workshop of the Scandinavian Society for Cell Toxicology 19-22 September, 2007, Salza, Germany. Toxicol In Vitro, 22(5):1349, April 2008.

H. Seibert, A. Jess, A. Linden, E. Maser, M. Perle and M. Gülden:

Peroxide-induced oxidative stress and cell death in C6 astrogloma cells. 16th Congress on Alternatives to Animal Testing September 2010, Linz, Österreich.

ALTEX 27th Volume, Supplement 1-168 (2010)

Abstract der Posterpräsentation

M. Perle, M. Gülden, E. Maser, S. Mörchel and H. Seibert:

Influence of antioxidants on peroxide-induced apoptotic and necrotic cell death in C6 astrogloma cells. 15th International Congress on In Vitro Toxicology 25-28 September, 2008, Stockholm, Sweden.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Edmund Maser für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler anzufertigen.

Dr. Hasso Seibert und Dr. Michael Gülden danke ich für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende Betreuung. Sehr dankbar bin ich für die fachlichen Diskussionen und Anregungen.

Ebenfalls möchte ich Sabine Seibert danken, die mir eine sehr gute Einarbeitung in den Bereich der Zellkultur ermöglichte und wie meine zahlreichen anderen Kollegen zu einem ausgezeichneten Arbeitsklima beitrug.

Des Weiteren danke ich Sibylle Brenner, Annika Anker, Antje Schweter, Milena Rüweler, Anne Kunert, Teresa Meyer, André Göhler, Anne Jess und Jessica Boldt sowie Jochen Stegk und Arne Linden für die tolle Zeit im Labor. Besondere Erwähnung sollten an dieser Stelle auch die konspirativen Zusammenkünfte im „Café zur Zelle“ und die „Doktoranden-, Praktikanten-, Diplomanden- und Masterrettentreffen“ finden. Besonders danke ich meinen Mitstreitern Michael Kisiela und Yasser El-Hawari für die IT-technische Unterstützung.

Sebastian Daum danke ich für das unermüdliche Korrekturlesen und die Durchhalteparolen.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, die mir während meines gesamten Ausbildungsweges jeder Zeit zur Seite standen.

Lebenslauf

Manuela Perle
Sternstraße 4
24116 Kiel

Geburtsdatum: 06/05/1975
Geburtsort: Hamburg
Nationalität: deutsch

Akademische Laufbahn

09/1995 – 02/1998 Studium der Chemie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel
09/1996 – 10/1998 Studium der Pharmazie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel;
10/1998 – 04/2001 Studium der Pharmazie, Albert-Ludwig-Universität, Freiburg;
05/2001 – 04/2002 Praktisches Jahr (Nottingham City Hospital, U.K.; City Apotheke, Kiel
Abschluss: Staatsexamen (06.06.2002)
12/2005 – 12/2010 Promotionsstudium, Institut für Pharmakologie und Toxikologie,
Christian-Albrechts-Universität, Kiel

Berufspraxis

07/2002 – 04/2008 Apothekerin in der Helgoland-Apotheke, Kiel
05/2008 – 12/2008 wissenschaftliche Mitarbeiterin am UKSH
01/2009 – 06/2010 Angestellte der Ferring GmbH, Abteilung QA

Schulbildung

08/1981 – 06/1994 Grundschule, Realschule und Gymnasium in Pinneberg
Abschluss: Abitur

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit - abgesehen von der Beratung durch die Betreuer - nach Inhalt und Form selbstständig erstellt worden ist und die Inhalte unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgesellschaft entstanden sind. Die Arbeit wurde weder vollständig noch in Teilen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Kiel, Oktober 2010

Manuela Perle